



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2016/17

**Tatiana João Ribeiro
Gonçalves Carneiro**

**Impacto metabólico da expressão dos oncogenes
KRAS e MYC em murganhos com pancreatite e
cancro pancreático**



**Tatiana João Ribeiro
Gonçalves Carneiro**

O impacto metabólico da expressão individual e conjunta dos oncogenes KRAS e MYC em murganhos com pancreatite e cancro pancreático

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica (especialização em métodos biomoleculares) realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Pissara Coelho Gil, Professora Associada com Agregação ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor António de Sousa Barros, Investigador Auxiliar Convidado na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Esta tese foi desenvolvida no âmbito do projeto CICECO-Aveiro Institute of Materials, POCI-01-0145-FEDER-007679 (FCT Ref. UID /CTM /50011/2013), financiado pelos fundos nacionais da FCT/MEC e co-financiado pela FEDER sob a parceria PT2020. Esta tese também teve o apoio da Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (RNRMN), suportada por fundos da FCT e pela bolsa da FCT SFRH/BSAB/113663/2015.

Dedico este trabalho ao meu avô pela imensurável motivação e à minha mãe
pelo incondicional apoio.

o júri

presidente

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
professor auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Luisa Alejandra Helguero
professor auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Maria Pissara Coelho Gil
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Desde já, eu e a Professora Ana Gil agradecemos ao Professor Kevin Brindle, do *Cancer Research Institute-Cambridge*, e ao Professor Gerard Evan, do *Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK*, pelo acesso aos modelos animais usados neste trabalho. Agradeço, também, o apoio das Doutoradas Eva Serrão e Nicole Sodir e Doutor Hu Deen, do *Cancer Research Institute – Cambridge e Department of Biochemistry*.

Quero, ainda, agradecer a todo o grupo de metabolómica da Universidade de Aveiro, por toda a ajuda prestada, dirigindo um especial agradecimento à Professora Ana Gil pela oportunidade única que me proporcionou ao permitir que eu fizesse parte deste projeto (que tanto contribuiu para me fazer crescer no mundo da ciência).

Agradeço, do fundo do coração, aos meus pais, pois foram imprescindíveis ao longo desta longa e árdua caminhada e sem eles o sonho de ser cientista não poderia tornar-se realidade. Um muito obrigada à minha restante família pelo apoio e motivação.

Para terminar, agradeço a todos os meus amigos que foram essenciais ao longo do meu percurso académico, em especial ao 4* (Joaca, Ju, Mari e Ti), à Danni, Té, Cátia e Cláudia, ao Johny e Pepe e à casa B.

Termino, recordando que “Deus quer, o homem sonha, a obra nasce” (Fernando Pessoa, Mensagem, 1934).

palavras-chave

Murganho, Metabolômica, RMN, Pancreatite, Cancro pancreático, Adenocarcinoma do ducto pancreático, Carcinoma sarcomatóide do pâncreas, gene KRAS e gene MYC.

resumo

O cancro pancreático (PC) corresponde à quarta principal causa de morte tumoral, sendo que a incidência desta doença é muito próxima à taxa de mortalidade a ela associada. O prognóstico para indivíduos com PC tem evoluído muito lentamente nas últimas décadas, devido ao avanço limitado nos métodos de diagnóstico e terapias. Sabe-se que o PC é caracterizado por alterações em 5 principais genes, sendo os oncogenes o KRAS e o MYC os mais relacionados com este tipo de cancro. Têm assim sido utilizados modelos de murganhos geneticamente modificados com a finalidade de descobrir os possíveis agentes moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão do PC. O presente trabalho utilizou a metabolômica por espectroscopia de RMN de ^1H , para caracterizar as alterações metabólicas resultantes de pancreatite (condição benigna) e do efeito da presença e ativação dos oncogenes KRAS e MYC no tecido pancreático de murganhos transgênicos. Para tal, na primeira parte (murganhos *wild-type* e modelo KRAS) analisaram-se extratos aquosos de pâncreas ($n=41$) e, numa segunda parte (modelos MYC e KRAS), extratos aquosos ($n=82$) e lipídicos ($n=71$) do mesmo órgão. Inicialmente, verificou-se que o perfil metabólico da pancreatite se distinguiu do tecido normal (alteração dos níveis de alanina, creatina, formato, fumarato, AMP, UMP, niacinamida, fenilacetato, GSH e ATP), e também do tecido com lesões neoplásicas PanIN de baixo grau (alteração dos níveis de alanina, creatina, fenilalanina e UDP-glucose ou --glucuronato). Além disso, verificou-se que a ativação do gene KRAS tem elevada influência nas alterações metabólicas que acompanham a evolução das lesões neoplásicas PanIN e o desenvolvimento dos tumores pancreáticos adenocarcinoma ductal e carcinoma sarcomatóide. A progressão da carcinogénese pancreática caracterizou-se pela diminuição de glutamina, 2-fosfoglicerato, fosfocolina, fosfoetanolamina, glicerofosfocolina e UDP-glucose ou --glucuronato e pelo aumento de 3-HBA, ascorbato, lactato, niacinamida, glucose e sacarose. Os dois tipos de tumor não apresentaram diferenças metabólicas significativas entre si. Na segunda parte do trabalho, verificou-se que o efeito da ativação individual do oncogene MYC promoveu mais alterações metabólicas do que a ativação conjunta dos oncogenes MYC e KRAS no metabolismo pancreático. A ativação do MYC caracterizou-se pela diminuição de glutamina, hipotaurina, isoleucina, compostos derivados da uridina e ácidos gordos e pelo aumento de glutamato, prolina, succinato e colesterol. A ativação do mesmo oncogene, na presença do KRAS, promoveu a diminuição de fosfocolina e glicerofosfocolina e o aumento de glutamina, GSH e succinato. Desta forma, concluiu-se que a metabolômica é uma estratégia promissora para a definição de biomarcadores metabólicos para o diagnóstico da pancreatite e dos vários estadios do PC.

keywords

Mice, Metabolomics, NMR, Pancreatitis, Pancreatic Cancer, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Sarcomatoid carcinoma of the pancreas, KRAS gene and MYC gene.

abstract

Pancreatic cancer (PC) is the 4th leading cause of tumor death its incidence approaching the levels of mortality associated with this disease. The prognosis for individuals with PC has evolved very slowly in the last decades due to the limited progress in methods of early diagnosis and therapy. It is known that PC is characterized by changes in 5 main genes, and the oncogenes most frequently affected are named KRAS and MYC. Therefore, genetically engineered mouse models have began to be used in order to discover the possible molecular agents involved in the development and progression of PC. The work within this thesis involved ¹H-NMR-based metabolomics to characterize the metabolic changes occurring in pancreatic tissue due to the benign condition of pancreatitis and, in transgenic mice, due to the presence and activation of KRAS and MYC oncogenes. In the first part of this work (wild-type mice and KRAS model), pancreatic aqueous extracts (n = 41) were analyzed and, in the second part (MYC and KRAS models), aqueous (n = 82) and lipidic extracts (n = 71) of the same tissue. Firstly, it was verified that the metabolic profile of pancreatitis was distinguished from normal tissue (changed levels of alanine, creatine, formate, fumarate, AMP, UMP, niacinamide, phenylacetate, GSH and ATP) and from tissue with low grade neoplastic lesions PanIN (changed levels of alanine, creatine, phenylalanine and UDP-glucose or -glucuronate). In addition, the activation of the KRAS gene has been shown to have a high influence on the metabolic changes during the evolution of neoplastic lesions PanIN and the development of pancreatic ductal adenocarcinoma and sarcomatoid carcinoma. Progression of pancreatic carcinogenesis was characterized by decreased levels of glutamine, 2-phosphoglycerate, phosphocholine, phosphoethanolamine, glycerophosphocholine and UDP-glucose or -glucuronate, and increased levels of 3-HBA, ascorbate, lactate, niacinamide, glucose and sucrose. No significant metabolic differences were observed between the two types of tumor. In the second part of this work, the individual activation of MYC oncogene was shown to promote more metabolic changes than the combined activation of MYC and KRAS oncogenes in the pancreatic metabolism. Activation of MYC was characterized by decreased levels of glutamine, hypotaurine, isoleucine, uridine derived compounds and fatty acids and by the increased levels of glutamate, proline, succinate and cholesterol. Activation of the same oncogene in the presence of KRAS promoted the decrease of phosphocholine and glycerophosphocholine and the increase of glutamine, GSH and succinate. These results show that metabolomics may be significantly useful to define metabolic biomarkers of pancreatitis and of PC onset and progression.

Índice

Objetivos.....	1
1. Introdução.....	2
1.1. O cancro pancreático: características clínicas e metabólicas.....	2
1.1.1. Características do cancro pancreático e evolução da carcinogénese	2
1.1.2. Alterações genéticas que influenciam o cancro pancreático	4
1.1.3. O metabolismo celular no cancro pancreático.....	9
1.1.4. Métodos de diagnóstico e potenciais terapias genéticas e moleculares.....	12
1.2. A metabolómica para a compreensão do metabolismo associado a patologias....	14
1.2.1. Definição de metabolómica e aplicações gerais	14
1.2.2. Técnicas analíticas: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espetrometria de massa (MS)	16
1.2.3. Análise estatística multivariada e univariada	20
1.3. Estado de arte: estudos metabolómicos em humanos e estudos metabólicos em murganhos transgénicos KRAS e MYC com cancro pancreático	23
1.3.1. Humanos.....	23
1.3.2. Murganhos KRAS	26
1.3.3. Murganhos MYC.....	31
2. Materiais e métodos	35
2.1. Grupos de murganhos transgénicos em estudo	35
2.2. Preparação de extratos de pâncreas de murganhos	38
2.3. Aquisição e análise dos espectros de RMN.....	39
2.4. Análise estatística multivariada e univariada.....	41
3. Resultados e discussão	44
3.1. Interpretação de espectros de RMN de ¹ H de extratos aquosos e lipídicos de pâncreas de murganhos	44
3.2. Metabolismo de murganhos com pancreatite (<i>wild-type</i>) e em vários estadios de cancro pancreático (modelo KRAS)	50
3.2.1. Escolha de estratégia de quantificação de metabolitos: absoluta ou relativa	50
3.2.2. Perfil metabólico de murganhos com pancreatite.....	53
3.2.3. Perfil metabólico de murganhos com diferentes estadios de cancro pancreático	54

3.2.4. Análise global e discussão do metabolismo de murganhos com pancreatite e KRAS.....	65
3.3. Metabolismo de murganhos MYC e MYCKRAS como modelos animais de cancro pancreático	78
3.3.1. Efeito de óleo alimentar e de tamoxifen em murganhos <i>Wild-type</i>	78
3.3.2. Efeito da ativação do oncogene MYC	95
3.3.3. Efeito da ativação dos oncogenes KRAS e MYC	109
4. Conclusão	120
Bibliografia.....	122

Lista de abreviaturas

3-HIVA - 3-hidroxi-isovalerato (do inglês *hydroxyisovalerate*)

AMP - Adenosina monofosfato (do inglês *adenosine monophosphate*)

AMPK - Proteína cinase ativada por AMP (do inglês *AMP-activated protein kinase*)

AST – Aspartato aminotransferase (do inglês *aspartate aminotransferase*)

ATP – Adenosina trifosfato (do inglês *adenosine triphosphate*)

BAD – Promotor de morte associado à Bcl-2 (do inglês *bcl-2-associated death promoter*)

BAX – Proteína X associada à Bcl-2 (do inglês *bcl-2-associated X protein*)

br – largo (do inglês *broad*)

HBP – Via da biossíntese da hexosamina (do inglês *hexosamine biosynthesis pathway*)

CA 19-9 – Antígeno carboidrato 19.9 (do inglês *carbohydrate antigen 19.9*)

CDK5 – Cinase dependente de ciclina 5 (do inglês *cyclin dependent kinase 5*)

CP – Pancreatite crônica (do inglês *chronic pancreatitis*)

ERK – Cinase regulada por sinal extracelular (do inglês *extracellular signal-regulated kinase*)

ES – Magnitude de diferenças (do inglês *effect size*)

FA – Ácido gordo (do inglês *fatty acid*)

GEMM – Modelo de murganhos geneticamente alterados (do inglês, *genetically engineered mouse model*)

GLS – Glutaminase (do inglês *glutaminase*)

GLUL – Glutamato-amônia ligase ou glutamina sintase (do inglês *glutamate-ammonia ligase*)

GPC - Glicerofosfocolina (do inglês *glycerophosphocholine*)

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG – Glutathiona oxidada

GTP – Trifosfato de guanosina (do inglês *guanosine triphosphate*)

HIF – Fator induzido por hipoxia (do inglês *hypoxia inducible factor*)

HRMAS – Alta resolução com rotação segundo o ângulo mágico (do inglês *high resolution magic angle spinning*)

IPMN – Neoplasia papilar mucinosa intra-ductal (do inglês *intra-ductal papillary mucinous neoplasm*)

MAPK – Cinase ativada por mitogénios (do inglês *mitogen-activated protein kinase*)

MCN – Neoplasia cística mucinosa (do inglês *mucinous cystic neoplasm*)

MS – Espectrometria de massa (do inglês *mass spectrometry*)

MVA – Análise multivariada (do inglês *multivariate analysis*)

NAD⁺ - dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (do inglês *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

OPLS-DA - Análise discriminante por projeção ortogonal das estruturas latentes - (do inglês *Orthogonal projection to latent structures – discriminant analysis*)

PanIN – Neoplasia intra-epitelial pancreática (do inglês *pancreatic intraepithelial neoplasms*)

PC – Cancro pancreático (do inglês *pancreatic cancer*)

PCA – Análise dos componentes principais (do inglês *principal component analysis*)

PDAC – Adenocarcinoma ductal pancreático (do inglês *pancreatic ductal adenocarcinoma*)

PDK1 – Cinase dependente de fosfoinositol 1 (do inglês *phosphoinositide-dependent kinase 1*)

PI3K – Fosfatidilinositol 3-cinase (do inglês *phosphatidylinositol 3-kinase*)

PKB/AKT – Cinase B (do inglês *protein kinase B*)

PLS-DA – Análise discriminante por projeção das estruturas latentes - (do inglês *Projection to latent structures – discriminant analysis*)

PPP – Via das pentoses fosfato (do inglês *pentose phosphate pathway*)

PTEN – Fosfatase e homólogo de tensina (do inglês *phosphatase and tensin homolog*)

RAF – Fibrosarcoma acelerado rapidamente (do inglês *rapidly accelerated fibrosarcoma*)

RalGEF – Fator de troca do nucleótido Guanina Ral (do inglês *Ral guanine exchange factor*)

TCA – Ciclo do ácido tricarboxílico (do inglês *tricarboxylic acid*)

TGF- β – Fator de transformação do crescimento β (do inglês *transforming growth factor- β*)

TMAO - *N*-óxido de trimetilamina (do inglês *trimethylamine N-oxide*)

TMS – Tetrametilsilano (do inglês *tetramethylsilane*)

TSG – Gene supressor tumoral (do inglês *tumor suppressor gene*)

TSP – Ácido 3-(trimetilsilil) propiónico (do inglês *3-(trimethylsilyl)- propionic acid*)

UDP-GlcNAc - Uridina difosfato-*N*-acetil glucosamina (do inglês *uridine diphosphate N-acetylglucosamine*)

UMP – Uridina monofosfato (do inglês *uridine monophosphate*)

UN – Ressonância com identificação desconhecida (do inglês *unknown*)

UVA – Análise univariada (do inglês *univariate analysis*)

VIP – do inglês *Variable importance to projection*

Objetivos

A presente tese reúne três objetivos principais, sendo que o trabalho apresentado se dividiu em duas partes. Na primeira parte estudaram-se modelos de murganhos KRAS e procuraram-se marcadores metabólicos que distinguíssem a pancreatite do tecido saudável e das lesões neoplásicas pancreáticas (PanIN) de baixo-grau (modelo KRAS). Além disso, pretendeu avaliar-se o efeito, provocado pela ativação do oncogene KRAS, no metabolismo da progressão das lesões neoplásicas e em dois tipos de cancro pancreático, adenocarcinoma ductal e carcinoma sarcomatóide. Numa segunda parte, estudaram-se modelos de murganhos MYC e MYCRAS e procurou avaliar-se o efeito da sobre-expressão individual do oncogene MYC e conjunta dos oncogenes KRAS e MYC no metabolismo do cancro pancreático. Para atingir estes objetivos, recorreu-se à metabolómica por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H para analisar extratos aquosos e lipídicos de tecido pancreático de murganhos transgénicos.

1. Introdução

1.1. O cancro pancreático: características clínicas e metabólicas

O cancro pancreático (*pancreatic cancer*, PC) é a 12^a forma de cancro mais comum em todo o mundo (1,2). É uma doença com elevada mortalidade, visto que o tumor na fase inicial de desenvolvimento é praticamente assintomático e apresenta uma progressão local ou metastizada muito elevada (1,3). Neste sentido, o PC é a 4^a maior causa de morte relacionada com cancro, sendo que 80% dos pacientes se encontra num estado avançado da doença aquando do diagnóstico (2,4). Deste modo, a taxa de incidência de PC é estatisticamente semelhante à sua taxa de mortalidade, sendo que nos Estados Unidos da América, durante o ano de 2015, foram diagnosticados com PC 49, 000 indivíduos tendo falecido, aproximadamente, 41, 000 (4). A taxa de sobrevivência após 5 anos tem-se mantido entre os 5-6%, nas últimas quatro décadas, refletindo assim a dificuldade na abordagem de diagnóstico e terapêutica do PC (2,4).

1.1.1. Características do cancro pancreático e evolução da carcinogénese

O PC pode ser classificado como endócrino ou exócrino consoante o foco carcinogénico se desenvolva nas células endócrinas ou exócrinas do pâncreas, respetivamente (2,5). Os tumores endócrinos representam apenas *ca.* 5% dos casos diagnosticados (5). Este tipo de tumor afeta as células α , β e δ constituintes dos ilhéus de Langerhans (Figura 1.1), responsáveis por produzirem hormonas como a glucagina, a insulina e a somatostatina. Por outro lado, os tumores exócrinos são os mais frequentes, representando 95% dos casos diagnosticados. Este tipo de tumores afeta as células epiteliais constituintes dos ácinos e dos canais transportadores (ductos), responsáveis por produzirem e transportarem enzimas digestivas (Figura 1.1) (2,5).

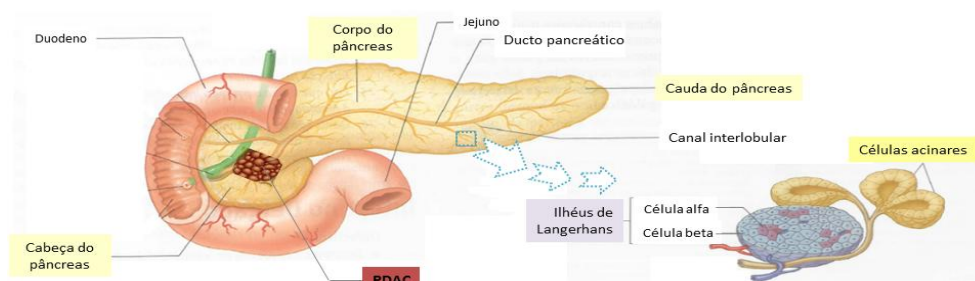


Figura 1.1 – Representação da anatomia pancreática humana: cabeça, corpo e cauda do pâncreas, ilhéus de Langerhans (parte endócrina) e células epiteliais acinares (parte exócrina); ilustração do desenvolvimento do adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) na cabeça do pâncreas (figura adaptada de (6)).

Comummente, os PCs de origem endócrina são também denominados de tumores neuroendócrinos pancreáticos (5). Estes tumores podem ser classificados como funcionais ou não-funcionais, caso o pâncreas lesionado tenha a capacidade de continuar ou não a produzir hormonas, respetivamente. Na maioria dos casos, os PCs endócrinos funcionais não são malignos, contrariamente ao que acontece no caso dos não-funcionais. No entanto, os PCs endócrinos não-funcionais, mesmo malignos, apresentam um prognóstico mais favorável que os PCs exócrinos. Estes últimos apresentam uma maior diversidade quanto à possível origem celular da carcinogénese e, portanto, quanto ao possível tipo de células afetadas (2,5). Assim, os PCs exócrinos podem ser classificados como carcinoma de células acinares e adenocarcinoma ductal (*pancreatic adenocarcinoma ductal*, PDAC) (Figura 1.1). Destes, o PDAC é a forma neoplásica de cancro pancreático mais comum, constituindo mais de 90% dos tumores pancreáticos no geral, pelo que esta é a forma da doença comumente designada por tumor pancreático. O desenvolvimento do PDAC pode resultar de lesões císticas como a neoplasia papilar intraductal mucinosa pancreática (*intra-ductal papillary mucinous neoplasm*, IPMN), a neoplasia cística mucinosa pancreática (*mucinous cystic neoplasm*, MCN) e a neoplasia intra-epitelial pancreática (*pancreatic intraepithelial neoplasm*, PanIN) (3,7). As lesões císticas não-neoplásicas, como a sérica e a linfo-epitelial, muito raramente evoluem para tumores malignos (7). As IPMNs correspondem a proliferações macroscópicas no ducto pancreático, que ocorrem com maior frequência na cabeça do pâncreas (3,7). Pelo contrário, muito mais raras que as IPMNs, as MCNs não comunicam com o ducto pancreático e ocorrem frequentemente no corpo e na cauda do pâncreas (3,7). Ambas as lesões são classificadas em 3 estádios em função do crescente grau de displasia associado (3). Normalmente, as PanINs são o tipo de lesão precursor mais prevalente no PDAC. Estas lesões correspondem a proliferações microscópicas não invasivas no ducto pancreático (3,8) e podem ser classificadas de PanINs-1 a -3, consoante o grau crescente de alteração citológica, respetivamente (3,4). As PanINs-1 e -2 podem surgir em indivíduos saudáveis ou com pancreatite crónica, sem nunca evoluírem para o PDAC (4). Todavia, as PanINs-3 vão desenvolvendo um carácter de displasia crescente, até originarem o carcinoma *in situ* (4,7). Após este pré-desenvolvimento maligno, é desencadeada uma intensa reação desmoplásica do estroma, a qual corresponde a uma substituição do tecido pancreático saudável por tecido conjuntivo fibroso. Na maioria das vezes, esta reação potencia o desenvolvimento da massa tumoral

no PDAC (2,3). Como consequência, a constituição do estroma no PDAC é heterógena, envolvendo vários tipos de células: estreladas pancreáticas, leucócitos e epiteliais. Como resultado, desenvolve-se um tecido fibroso denso com pouca vascularização, limitando a circulação, e com consequente propensão para a hipoxia. Este microambiente, criado pelo tumor, fortalece o seu carácter imunossupressor (2,7). Mais concretamente, este tipo de tumor distingue-se de outros por ter uma elevada complexidade genómica, resultante de mutações cumulativas em oncogenes e gene supressores tumorais chave (1), conforme irá ser abordado posteriormente. Uma outra característica que distingue o PDAC é a sua alta plasticidade celular, pois uma minoria das células cancerígenas pode apresentar características de células estaminais (1). Assim, estas células conseguem adaptar o seu funcionamento de forma a contrariar as condições adversas do ambiente externo (2). À semelhança de outras patologias, indivíduos com características que se enquadrem em determinados fatores de risco têm maior propensão para desenvolverem PDAC. Os fatores de risco podem ser modificáveis ou não-modificáveis, consoante, possam ou não ser influenciados pelas ações dos indivíduos. Os fatores de risco modificáveis abrangem o tabagismo, o alcoolismo, a obesidade, as dietas ricas em gorduras, pobres em vegetais e vários outros aspetos do estilo de vida dos indivíduos. Os fatores de risco não-modificáveis incluem o envelhecimento, histórico cancerígeno familiar, determinadas patologias, como a *diabetes mellitus*, grupo sanguíneo O, a pancreatite, entre outros (9). Indivíduos do género masculino e afro-americanos parecem ter maior tendência para desenvolverem PDAC.

Muito brevemente, a pancreatite representa uma inflamação do pâncreas que comumente advém da anormal ativação das enzimas digestivas produzidas na componente exócrina deste órgão (6). Dependendo se o período de inflamação é curto ou persistente, a pancreatite pode ser classificada como aguda ou crónica, respetivamente. De um modo geral, a pancreatite promove a necrose pancreática, pelo que é muito importante o diagnóstico precoce e específico desta patologia. Além disso, como mencionado anteriormente, esta patologia poderá ser um fator de risco para o desenvolvimento do PC, sendo importante a sua diferenciação da carcinogénese (9).

1.1.2. Alterações genéticas que influenciam o cancro pancreático

A componente genética está fortemente relacionada com a predisposição e o desenvolvimento do cancro, de um modo geral (1). No caso do PDAC, foram já

reconhecidas possíveis regiões cromossômicas relacionadas com a maior suscetibilidade cancerígena. Sabe-se assim que as alterações ocorrem, principalmente, em 4 genes: mutações no oncogene KRAS e inativação dos genes supressores-tumorais CDKN2A (9q21), TP53 (17p13) e SMAD4 (18q21) (1, 5, 10, 11). O oncogene MYC (8q24) encontra-se também amplificado com frequência em vários tumores, incluindo o PDAC (10). Além das modificações anteriormente mencionadas, outras ocorrem com menor frequência (< 10%), afetando diferentes genes como STK11/LKB1 e HER-2/neu, BRCA1, BRCA2, MLL3, MLH1, e MSH2 (5, 7, 11). Nas lesões PanIN1-2, existem mutações somáticas no gene KRAS e alterações no gene CDKN2A (Figura 1.2), sendo estes alterados logo no início do desenvolvimento precoce da carcinogênese (3). Por outro lado, as alterações no TP53 e a perda funcional do SMAD4 ocorrem já no desenvolvimento das PanIN3 e do próprio carcinoma *in situ* (Figura 1.2). Pensa-se que o oncogene MYC esteja amplificado precocemente, como o gene KRAS (Figura 1.2).

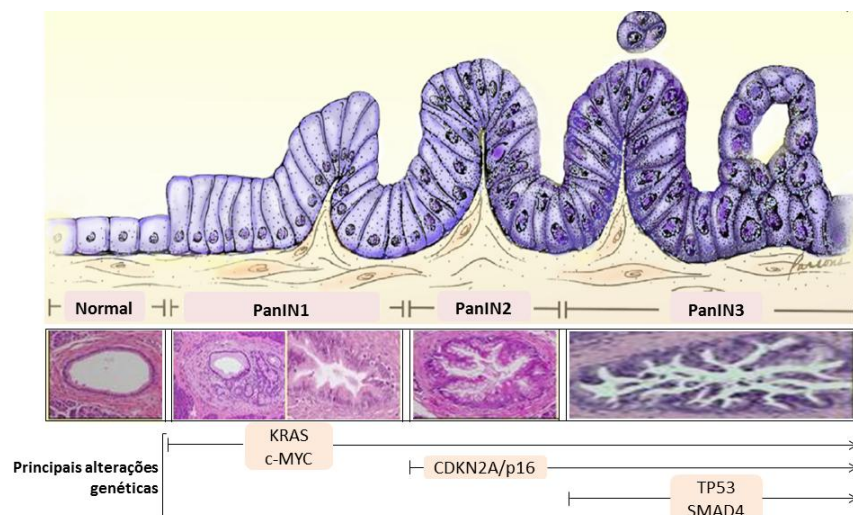


Figura 1.2 – Evolução do grau de neoplasia do PDAC, a partir da lesão precursora mais prevalente, a PanIN, e as respectivas alterações genéticas associadas a cada grau de lesão (figura adaptada de (7) e (11)).

O gene KRAS é um membro da família RAS e codifica enzimas que hidrolisam o trifosfato de guanosina (*guanosine triphosphate*, GTP). Estas enzimas são denominadas de GTPases e medeiam a sinalização de fatores de crescimento (3,5). O gene KRAS controla diferentes vias de sinalização que regulam processos de proliferação, de diferenciação, de sobrevivência e de migração celular (5). As mutações somáticas e pontuais neste gene evidenciam-se em mais de 90% dos casos diagnosticados com o PC (3,7). Estas mutações

ocorrem sobretudo no codão G12 (82%), alterando o resíduo de glicina para aspartato ou valina (G12D e G12V, respetivamente) no domínio catalítico da GTPase (2,5,14). Contudo, também são encontradas mutações mais improváveis nos codões Q61 (14%) e G13 (< 1%) (5,14). Assim, as alterações biológicas dependem do codão onde incide a mutação (12). No PDAC, a conformação ativa do KRAS é continuamente expressa, o que contribui para a evolução tumoral a partir das PanIN (3,7,10). A frequência deste tipo de mutações aumenta com o grau de neoplasia do tumor, sendo praticamente universais em indivíduos com PC diagnosticados em estadios avançados (2). Por outro lado, a atividade alterada do KRAS resulta num aumento do crescimento e da proliferação celular, da diminuição da apoptose, do aumento da macropinocitose e, consequentemente, potencia um fenótipo mais invasivo (2,5).

A ativação do KRAS expressa-se principalmente através de vias de sinalização como RAF/MEK/ERK, PI3K/PTEN/AKT e RAL-GEF (5,14). Na primeira via mencionada, o KRAS consegue mediar a ativação da via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) através da ação direta das RAFs (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) cinases (13,14). Durante a ativação do KRAS, estas enzimas são recrutadas para a membrana plasmática e aí ativadas. Assim, adquirem a capacidade de fosforilar as cinases MEKs 1 e 2, que ativam as ERKs 1 e 2 (*extracellular signal-regulated kinases*), as quais ativam vários processos celulares proliferação, diferenciação e sobrevivência, pois influenciam a transcrição de diferentes genes alvo (12). Na segunda via mencionada, as cinases B (*protein kinases B*, PKB/AKT) e as cinases dependente de fosfoinositol (*phosphoinositide-dependent kinases 1*, PDK1) são ativadas (5,14). Deste modo, a AKT promove a ativação da via alvo da rapamicina nos mamíferos (*mammalian target of rapamycin*, mTOR), reduzindo a apoptose e aumentando, consequentemente, a proliferação das células tumorais. A AKT influencia, ainda, vias reguladas pelos promotores pró-apoptóticos, BAD (*bcl-2-associated death promoter*) e BAX (*bcl-2-associated X protein*), e vias de controlo do ciclo e proliferação celular a partir de ciclinas. Por outro lado, a enzima PDK1 é importante para os processos de ativação de várias proteínas implicadas na progressão tumoral do PDAC, como as proteínas cinase A e cinase C. Fundamentalmente, a via da PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*) é essencial para a inibição da apoptose e para a manutenção das características tumorais, o que é confirmado pela desregulação, em estados mais avançados do tumor, da enzima PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), a

qual inativa a via PI3K (5,13,14). Na última via mencionada, a função do fator de troca do nucleótido Guanina Ral (*Ral guanine exchange factor*, RalGEF) ainda não é bem conhecida. Sabe-se que o RalGEF está sobre-expresso no PDAC, porque as GTPases que este fator ativa também o estão - RalA e RalB. Neste sentido, a elevada expressão destas GTPases está relacionada com a iniciação da metastização. Por outro lado, a RalA parece ter como alvo a mesma via que a CDK5 (*cyclin dependent kinase 5*), pois induzem o mesmo fenótipo quando deixam de ser expressas (12). Apesar da sua forte relação com o PC, o oncogene KRAS não pode ser usado como biomarcador tumoral, pois também ocorrem mutações neste oncogene noutros tipos de tumores, como o do pulmão e o do cólon (7,14,15). É importante reconhecer que é o conjunto das mutações nos vários genes que potencia o quadro clínico característico do PC. O oncogene KRAS tem um papel ativo na iniciação e manutenção tumoral, mas menos ativo na sua progressão (5,7).

A família dos oncogenes MYC é constituída pelo c-MYC, l-MYC e n-MYC, todos eles relacionados com a carcinogénese pancreática, principalmente a humana. Genericamente, os oncogenes MYC codificam proteínas diméricas nucleares com uma estrutura secundária hélice-*loop*-hélice e que funcionam como fatores de transcrição, pois têm facilidade em ligar-se ao DNA (15). Neste sentido, os oncogenes MYC influenciam processos como a replicação do DNA, a translação do RNA e a transcrição de vários genes (17–20), controlando mecanismos celulares como a proliferação, a diferenciação, a apoptose e o metabolismo. Normalmente, nas células saudáveis, a expressão dos MYC é relativamente baixa, aumentando durante a síntese de organelos nas células pancreáticas. Todavia, nas células tumorais do tipo PDAC, a necessidade da sucessiva divisão celular promove diversos sinais mitogénicos, os quais interagem com o núcleo e promovem o aumento da expressão deste oncogene (15,20). O carácter oncogénico dos MYC está também associado à ativação de determinadas vias com efeito pro-tumorigénico, como é o caso da ARF/MDM2/p53 (15). O c-MYC é o gene regulador mais associado ao PDAC (16), uma vez que se encontra amplificado em cerca de 15-30% dos casos deste tipo de tumor (10). Contudo, a expressão da proteína codificada pelo gene c-MYC encontra-se aumentada em cerca de 70% dos casos de PDAC (16,17). Logo, supõem-se que o fator nuclear de células T ativadas contribui para a ativação direta do promotor do c-MYC e consequente sobre-expressão da proteína (16). A expressão do MYC é diferente para os distintos estadios tumorais, no entanto, os níveis da expressão deste oncogene parecem

estar relacionados com o desenvolvimento tumoral inicial (15). Os oncogenes KRAS e MYC funcionam de forma articulada, uma vez que KRAS potencia a expressão de MYC, ao passo que MYC ativa os fatores de transcrição necessários para a reprogramação do metabolismo celular no PDAC (5). Assim, as vias afetadas e reguladas pelo MYC são semelhantes às anteriormente mencionadas no caso do KRAS.

A progressão da carcinogénese necessita da inativação de determinados genes supressores tumorais (*tumor suppressor genes*, TSGs), pois a sua principal função é impedir a continuação do ciclo celular, promover a apoptose ou induzir senescência celular. Com a sua inativação, estes genes perdem funções e a proliferação tumoral aumenta drasticamente, conforme acontece no PC (5). Deste modo, deleções ou mutações inativadoras no CDKN2A ocorrem com elevada frequência (3,10). Estima-se que em cerca de 90-95% dos casos com PC, o supressor tumoral CDKN2A perde a sua função de codificar a proteína p16/INK4A (3,5,22). Como tal, a regulação da transição da fase G1 para a fase S no ciclo celular é impedida (1,13). A inativação do CDKN2 ocorre imediatamente à sobre-expressão do KRAS. Por outro lado, o *locus* do CDKN2 também codifica o TSG p14ARF. Contudo, a perda da função da proteína p16 parecer ser mais importante para a progressão tumoral, comparativamente à p14 (5). Um outro TSG, com 75% de frequência de mutações somáticas, é o TP53, gene que codifica para o fator de transcrição p53 (5,10). Assim, as mutações *missense* (mutação com troca de sentido) promovem substituição de amino ácidos, pelo que o p53 deixa de ter a capacidade de induzir a expressão de genes que impedem a continuação do ciclo celular, como o CDKN1A/p21, BAX, entre outros (5). Por outro lado, existe evidência de que a inativação do p53 está relacionada com a elevada proliferação de metástases no PDAC, através de mecanismos dependentes e independentes do recetor β do fator de crescimento derivado de plaquetas (5). A importância do papel da inativação do TP53 na carcinogénese é bem evidenciada pelo facto de ocorrer em vários tumores (3,10). Por último, o SMAD4 também se encontra inativo devido a deleções em 50% dos carcinomas de um modo geral. Este gene medeia a ação da sinalização do fator de transformação do crescimento β (*transforming growth factor- β* , TGF- β) (3,5,10). Durante a carcinogénese, o TGF- β não consegue, indiretamente, reprimir a expressão do fator (regulador gastro-intestinal) Klf5. Deste modo, o fator Klf5 coopera com o fator de transcrição Sox4, levando ao aumento da progressão do PDAC e auxiliando, consequentemente, o passo final da iniciação tumoral

(5). No entanto, este tumor caracteriza-se por uma natureza complexa e com elevada heterogeneidade. Logo, nem todos os tumores pancreáticos apresentam as mesmas vias de sinalização e metabólicas alteradas e, dentro da mesma via, a principal mutação precursora parece diferir entre PCs (1).

1.1.3. O metabolismo celular no cancro pancreático

A alteração e a reprogramação do metabolismo são fundamentais para o desenvolvimento e progressão tumoral, pois permitem suportar a elevada taxa de proliferação nas células tumorais (1,14,37). O PDAC é caracterizado por apresentar uma elevada plasticidade metabólica que lhe permite, sobretudo, obter energia rapidamente e/ou blocos de construção para o crescimento celular e, ainda, manter o balanço *redox* para diminuir os efeitos do *stress* oxidativo (2,38,39). Além disso, a reprogramação metabólica também é essencial para a resistência a terapias e para a imunossupressão. Esta plasticidade é predominantemente garantida pelas alterações no oncogene KRAS e pela elevada expressão do MYC (25). As principais vias metabólicas alteradas nas células do PDAC relativamente a células saudáveis são as seguintes: glicólise aeróbia, via biossintética da hexosamina (*hexosamine biosynthesis pathway*, HBP), via das pentoses fosfato (*pentose phosphate pathway*, PPP) (Figura 1.3) e metabolismo lipídico (lipogénese e lipólise), (2,41–43). As células no PDAC diferem das restantes células tumorais na utilização da glutaminólise para renovação do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (*reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) ao invés da sua utilização para a ativação do ciclo do ácido tricarboxílico (*tricarboxylic acid*, TCA) (Figura 1.3), conforme será explicado a seguir (12).

As células no PDAC apresentam uma elevada capacidade para metabolizar glucose, ativando a glicólise. Estas alterações são promovidas pela elevada ativação conjunta do KRAS e do MYC, com o consequente aumento da expressão do transportador de glucose GLUT-1 e as enzimas hexocinase-1 e -2 e fosfofrutocinase-1 (Figura 1.3) (14,44,45). Por outro lado, a ativação do KRAS promove a disfunção mitocondrial, o que diminui a absorção celular de oxigénio e o consequente fluxo do ciclo TCA (14,40,46). Assim, o piruvato é utilizado na fermentação láctea ao invés do ciclo do TCA. Como tal, conforme acontece noutras formas tumorais, o efeito de Warburg é potenciado, sendo que o KRAS, o MYC e o TP53 potenciam a atividade da enzima lactato desidrogenase A, através da redução da acetilação do resíduo 5 da lisina. Vários outros intermediários da glicólise são

redirecionados para o metabolismo anabólico, através da HBP e da PPP (Figura 1.3) (12,25).

Quanto à via HBP, a glucose e a glutamina são convertidas em uridina difosfato-N-acetilglucosamina, o maior substrato para a glicosilação de proteínas e lípidos (Figura 1.3) (40,47). O papel da glucosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase 1 é potenciado pela ação do KRAS, o que promove consequentemente a HBP (Figura 1.3) (2,40,47). Assim, esta via funciona como um elo entre a glicólise e a glutaminólise, coordenando a incorporação de nutrientes (2,14,40). As alterações nas vias glicolíticas no PDAC parecem estar relacionadas com a ativação da via Raf/MEK/ERK pelo KRAS (32). O MYC produz efeitos semelhantes no metabolismo, uma vez que o efeito do KRAS no metabolismo, ao nível da transcrição, é mediado pelo MYC (2,25). A via PPP compreende duas fases distintas. Uma fase oxidativa, cuja finalidade é a produção da ribose-5-fosfato, para a biossíntese de novos nucleótidos, e a regeneração de NADPH, e uma outra não-oxidativa, que garante o fluxo da fase oxidativa através da regeneração de glucose-6-fosfato (Figura 1.3) (2,14,48). O MYC redireciona intermediários da glicólise para a PPP, potenciando esta via (40,49). Deste modo, a fase oxidativa é maioritariamente estimulada no controlo *redox* e na biossíntese de diferentes moléculas, quando o NADPH é um cofator da reação. Por outro lado, a fase não-oxidativa é maioritariamente estimulada durante a multiplicação para duplicar o genoma nas células-filhas. No entanto, a ativação do KRAS potencia a ação das enzimas ribulose-5-fosfato isomerase e ribulose-5-fosfato-3-epimerase e, consequentemente, exacerba apenas a fase não-oxidativa. Consequentemente, a renovação de NADPH é garantida pelo metabolismo da glutamina (2,14,48).

A glutaminólise é um processo anabólico que consiste na conversão da glutamina em glutamato, pela glutaminase, e na consequente conversão do glutamato em α -cetoglutarato (Figura 1.3). Nas células saudáveis e noutro tipo de células tumorais esta conversão do glutamato é catalisada pela glutamato desidrogenase 1. Nas células do PDAC esta enzima é inibida em prol da ativação da aspartato aminotransferase mitocondrial (*aspartate transaminase*, AST), pelo oncogene KRAS (Figura 1.3). Logo, neste processo forma-se aspartato a partir do oxaloacetato, sendo que o aspartato é convertido novamente em oxaloacetato pela ação da AST citosólica (Figura 1.3). Deste modo, o oxaloacetato é convertido em malato (pela ação da malato desidrogenase) e este é consequentemente convertido, pela enzima málica, em adenosina trifosfato (*adenosine triphosphate*, ATP) e

NADPH (Figura 1.3) (14,50). O NADPH produzido por esta via possibilita às células no PDAC uma maior resistência ao *stress* oxidativo, dificultando os métodos que usam as espécies reativas de oxigénio como estratégia terapêutica. Esta via também é importante para manter os níveis de glutathione reduzida, um importante antioxidante (2,50).

O metabolismo lipídico é essencial para o crescimento do tumor (1,2,51). As células no PDAC recorrem com maior frequência a mecanismos de lipogénese e lipólise, comparativamente a células saudáveis, o que se confirma pela maior expressão das enzimas ácido gordo sintase e ATP citrato liase (40,43). Sabe-se que a sobre-expressão destas enzimas é potenciada pelo MYC, que desempenha um papel tanto anabólico como catabólico no metabolismo lipídico (37,38). Contudo, as células tumorais utilizam preferencialmente o material lipídico extracelular como precursor de ácidos gordos (*fatty acid*, FA). Assim, as células não consomem substratos como a acetil-CoA, oxigénio e NADPH para a síntese de FA, pelo que podem utilizá-los noutras vias metabólicas (2,54). Depois dos lípidos extracelulares serem incorporados, são hidrolisados para a obtenção celular de FA e glicerol (2). Deste modo, a formação das membranas celulares, das células recém-formadas, consome grande parte dos FA, ao passo que o glicerol pode ser convertido em di-hidroxiacetona, potenciando a glicólise. Esta estratégia é característica de um genoma com o KRAS alterado (2,54). Por outro lado, no PDAC, os FA apresentam um maior grau de saturação comparativamente às células saudáveis, o que contribui para a resistência ao *stress* oxidativo das células tumorais (1,55).

Por último, as células do PDAC usam, muito frequentemente, processos para complementarem as suas fontes nutricionais e proliferarem com maior facilidade nas condições de hipoxia e baixa vascularização. A autofagia e a macropinositose são dois exemplos de processos catabólicos que promovem a reciclagem de organelos e macromoléculas intracelulares e extracelulares danificadas, respetivamente (12,25). Através dos substratos obtidos (amino ácidos, FA, ATP, nucleosídeos e outros) as células potenciam o metabolismo mitocondrial (14,56) e, por vezes, a glicólise (14,57). Apesar da autofagia ter um carácter anti- ou pro-tumorigénico, no PDAC atua em favor do crescimento do tumor, através das vias AKT/mTOR e AMPK/mTOR (43,44). A autofagia e a macropinositose são potenciadas pela ativação do KRAS, mas é o gene supressor tumoral TP53 que controla este papel do KRAS (40,60).

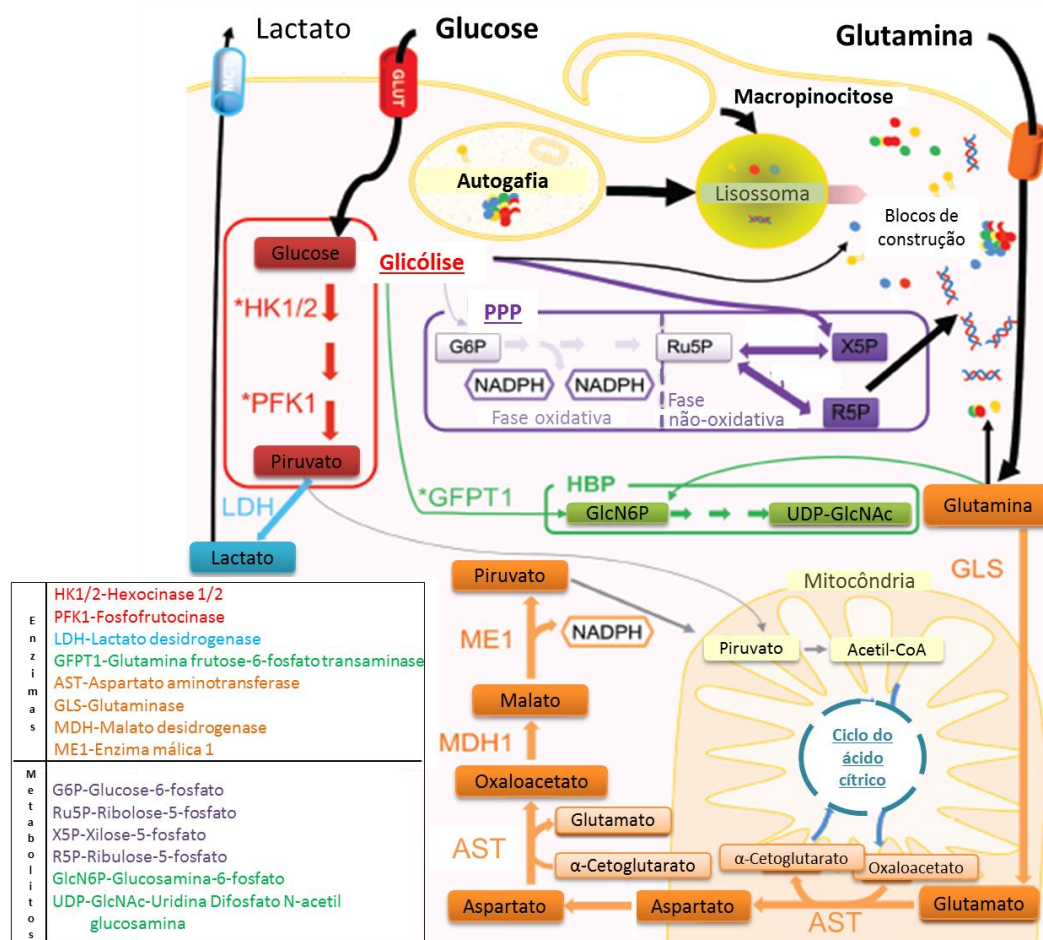


Figura 1.3 – Representação esquemática das principais vias metabólicas alteradas no PDAC em resposta à atividade exacerbada do oncogene KRAS: glicólise com redirecionamento do piruvato para a fermentação láctica, via das pentoses-fosfato (PPP), via da biossíntese da hexosamina (HBP) e glutaminólise (figura adaptada de (2)).

1.1.4. Métodos de diagnóstico e potenciais terapias genéticas e moleculares

Os principais métodos de diagnóstico recorrem à análise do sangue para procurarem perturbações nos níveis dos biomarcadores tumorais e/ou a análise imagiológica dos tecidos para encontrarem possíveis alterações histológicas. Além disso, recorrendo à análise do sangue, podem ser observados níveis de possíveis indicadores de PDAC associado à obstrução hepatobiliar como a alcalina fosfatase, a γ -glutamyl transferase, a bilirrubina e a razão aspartato transferase/alanina transferase (7). Alguns exemplos de biomarcadores séricos para o diagnóstico do PDAC são o antígeno carcinoembrionário, a molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário-1, o antígeno de cancro 125, o antígeno carboidrato 19.9 (*carbohydrate antigen 19.9*, CA 19-9) (3,7). Neste sentido, o CA 19.9 é o biomarcador mais utilizado no diagnóstico do PDAC (7), pois

apresenta uma sensibilidade de 79-81% (tumores mais pequenos) e uma especificidade de 82-91% (46). Todavia, a aplicabilidade do CA 19.9 diminui, uma vez que os seus níveis também estão aumentados noutras patologias pancreáticas, como a pancreatite aguda e crónica, abscessos e cistos pancreáticos, entre outras (7,24). Por outro lado, as principais técnicas imagiológicas compreendem a ecografia abdominal, a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética, endoscopia de ultrassom, entre outras (*e.g.* *MR Cholangiopancreatography* (MRCP), *Endoscopic Retrograde CholangioPancreatography* (ERCP)) (7). A biopsia do pâncreas é, normalmente, aplicada de forma a confirmar o diagnóstico de cancro pancreático, previamente sugerido por técnicas como aquelas já mencionadas, por ser um método invasivo (24).

Após o diagnóstico de PDAC, a implementação de terapia ou conjugação de terapias é imperativa para evitar a propagação tumoral. No entanto, o PDAC é caracterizado pela elevada resistência a terapias (48) e, atualmente, a melhor forma de tratamento do PDAC continua a ser a intervenção cirúrgica para a remoção dos tecidos neoplásicos (7,26). Com o recurso à cirurgia, a sobrevivência do paciente, após 5 anos de diagnóstico, aumenta em 20 a 40% (5,8). Contudo, este método de intervenção só tem sucesso quando o tumor se encontra nos estadios iniciais de desenvolvimento. Diversas abordagens procuram melhorar o prognóstico dos pacientes através da combinação da cirurgia com terapias auxiliares, como a quimioterapia, a radioterapia, a quimioradioterapia, entre outros (50,51). Assim, e desde 1997, a gencitabina ($C_9H_{11}F_2N_3O_4$) tem sido o fármaco de referência usado nos pacientes diagnosticados, devido à sua elevada eficiência e menores efeitos adversos face a outros fármacos (26,52). A gencitabina é um análogo de pirimidina e atua através da inibição da síntese de ácidos nucleicos (8). A combinação deste fármaco com outros (*e.g.* irinotecano, a fluorouracila, a capecitabina e análogos da planita, cisplatina e oxaliplatina) tem sido um método adotado para aumentar a probabilidade de sobrevivência dos pacientes com PC diagnosticado (7)(52). Os resultados mais promissores de todos os fármacos incidiram nas fases tumorais I e II. No Japão, estão a ser desenvolvidos testes com o uso combinado da gencitabina e do S-1 (derivado da fluoropirimidina) (53). Nos últimos anos, o FORFIRINOX, uma combinação de ácido fulínico, fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina, surgiu como uma terapia farmacológica promissora, contudo os sinais de toxicidade foram elevados (52). Esta formulação atua ao nível da replicação e transcrição do DNA (54). Recentemente, e numa tentativa de contornar estes efeitos de toxicidade, foi

testada gencitabina associada a nanopartículas de albumina ligada a plactaxel (55). Este composto bloqueia a progressão da mitose, uma vez que se liga aos microtúbulos, estabilizando-os, e impedindo a sua dissociação (54). Os resultados deste estudo foram mais promissores que os da monoterapia com gencitabina, os efeitos tóxicos foram menores que os do FORFIRINOX e eficiência em casos de metastização foi maior (56,57). Os dois tratamentos anteriormente descritos não são, no entanto, aconselhados a pacientes com estados débeis, pois prejudicam também as células sãs de rápida divisão (54). Por último, a associação da gencitabina com o erlotinibe, atualmente, é a única terapia dirigida aprovada e disponível para pacientes com PDAC. A erlotinibe é um inibidor da tirosina cinase EGFR, pelo que a via do EGF é inibida (5). Assim, a terapia direcionada para o PDAC precisa ainda de ser desenvolvida. Com o aumento de estudos sobre o funcionamento molecular anormal do PDAC, já têm sido explorados possíveis tratamentos que procuram inibir vias de sinalização e vias metabólicas específicas e características do PDAC (58).

1.2. A metabolómica para a compreensão do metabolismo associado a patologias

1.2.1. Definição de metabolómica e aplicações gerais

Os processos biomoleculares, num organismo, estão relacionados. Neste sentido, alterações epigenéticas e modificações pós-traducionais a que os genes e as proteínas estão sujeitas, respetivamente, podem refletir-se a nível funcional através de alterações enzimáticas e consequentes alterações no metaboloma. O metaboloma é definido como o conjunto de metabolitos existentes num organismo, pelo que varia em termos de tamanho e complexidade consoante o organismo em questão. Os metabolitos são definidos como moléculas com um peso molecular inferior a 1,000 Da e representam os principais blocos biológicos de construção e de reposição das reações bioquímicas (59). Deste modo, os metabolitos descrevem o genótipo e fenótipo de um sistema biológico, pelo que o seu estudo é relevante para compreender as alterações que neste sistema ocorrem.

Para compreender a interação entre os metabolitos e o consequente dinamismo do metaboloma, no final dos anos 90, desenvolveu-se a metabolómica. Atualmente, os conceitos de metabolómica e metabonómica são usados indiferenciadamente, sendo o termo metabolómica o mais usual. No entanto, numa fase mais inicial estes eram aplicados em contextos diferentes. Oliver Fiehn (1998) descreveu a metabolómica como a deteção e a quantificação de metabolitos produzidos nas células vivas, enquanto Jeremy Nicholson

(1999) descreveu a metabonômica como o estudo das alterações metabólicas que decorrem na resposta de uma perturbação biológica (*e.g.* doença, terapia farmacológica, etc...), na tentativa de manter a homeostasia. Atualmente, a metabolômica procura detetar e quantificar os metabolitos existentes numa dada amostra biológica, possibilitando a análise de biofluidos (plasma sanguíneo, urina, saliva, etc), tecidos e células. A metabolômica procura, ainda, compreender quais dos metabolitos detetados é que estão significativamente alterados e associados aos fenótipos dos sistemas biológicos em questão. Deste modo, a metabolômica é usada para uma visão holística do perfil metabólico de uma amostra, procurando relacionar os resultados com as possíveis vias metabólicas afetadas. Como a metabolômica permite estudar perfis metabólicos *in vivo* e compreendê-los fenotipicamente (*metabolic phenotyping*) (60), é uma ferramenta complementar à genómica/transcriptómica e à proteómica (59,61), estando cada vez mais associada a domínios como a medicina personalizada, a patofisiologia, a farmacologia, a toxicologia e, ainda, estudos alimentares e nutricionais (62). Contudo, o principal objetivo da metabolômica é a descoberta de novos biomarcadores identificativos de patologias. O cancro é uma das classes patológicas mais estudada, na tentativa de constituir métodos de diagnóstico não invasivos, rápidos e fiáveis (62). Neste sentido, cancros como o pancreático (63,64), o renal (65), o mamário (66), colorretal (67,68), entre outros têm sido alvos de vários estudos. Conforme será abordado em maior pormenor posteriormente, a metabolômica conjuga o uso de técnicas instrumentais, estatísticas e bioinformáticas para alcançar os seus objetivos (69,70). Assim, os diferentes estudos metabolômicos possuem um fluxo de trabalho semelhante entre si (Figura 1.4) (71). Após a recolha das amostras, estas são analisadas por técnicas analíticas e os respetivos resultados são adquiridos. Depois desta aquisição os resultados são pré-processados, o que engloba o ajustamento da linha de base, o alinhamento, a normalização e o *scaling*. Com este processamento, pretende-se reduzir as variações que possam ter sido introduzidas externamente e evidenciar, apenas, as variações metabólicas intrínsecas à amostra. O alinhamento permite diminuir potenciais variações na posição dos vários sinais de um espectro, em termos de desvios-químicos, frequências ou características (*features*). A normalização estabelece um referencial no qual as amostras são comparáveis, pois diminui variações provocadas por diferenças de concentração, entre outras. O processo de *scaling* transforma a amplitude (intensidade, área, etc) de cada variável (desvios químicos, frequências, características) e

regula a contribuição de cada uma, por exemplo, enaltece as diferenças mais pequenas entre as amostras (espectros), ou atribui a mesmo peso a todas as variáveis.

Ao longo das últimas décadas, os estudos na área da metabolómica têm vindo a aumentar, promovendo uma elevada quantidade de informação. Para que esta informação seja organizada e disponibilizada regradamente, existem já algumas bases de dados descritivas de metabolitos, como a HMDB (*Human Metabolome Database*), a SMPDB (*Small Molecule Pathway Database*) e a KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (59).

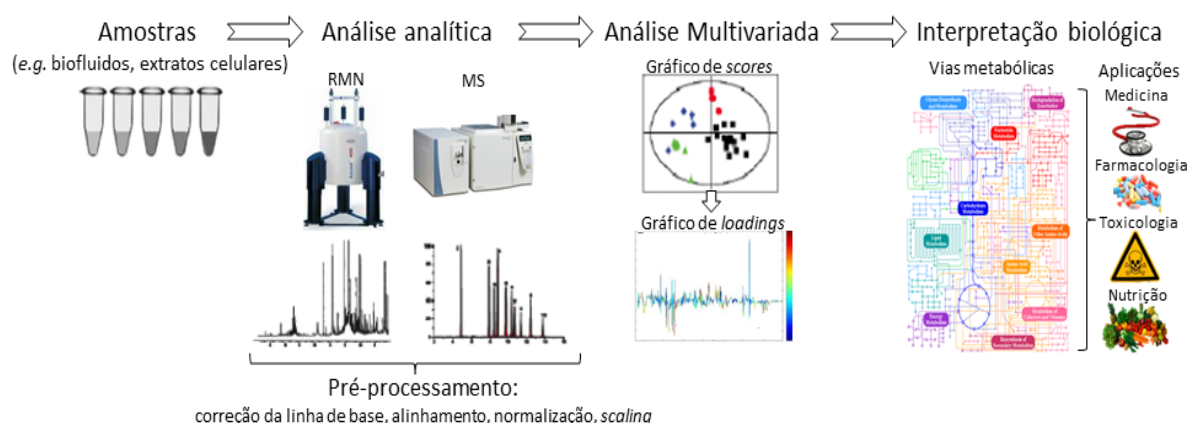


Figura 1.4 – Esquema ilustrativo do *workflow* geral dos estudos em metabolómica

1.2.2. Técnicas analíticas: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS)

As técnicas instrumentais mais utilizadas nos estudos metabolómicos são a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massa (*mass spectrometry*, (MS)), frequentemente acoplada à cromatografia líquida (LC) ou à de fase gasosa (GC). Tem-se vindo a comprovar que estas técnicas se complementam, detetam e identificam o maior número de metabolitos possível (72). A escolha da técnica instrumental depende amplamente do objetivo do estudo, sendo que nesta tese a técnica adotada foi a espectroscopia de RMN. Os princípios de funcionamento e características diferem entre ambas as técnicas, pelo que o seu uso acarreta vantagens e desvantagens associadas (73). A reprodutibilidade e a sensibilidade são os dois parâmetros onde reside uma maior complementaridade entre a espectroscopia de RMN e a espectrometria de massa. Deste modo, a espectroscopia de RMN é mais reprodutível, ao passo que a espectrometria de massa é mais sensível (95).

A espectroscopia de RMN baseia-se nas propriedades magnéticas de determinados núcleos atômicos, como por exemplo ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P , quando é aplicado à amostra um campo magnético forte e homogêneo (B_0). Estes núcleos atômicos possuem cargas associadas e movimentam-se em torno de um dos seus eixos, denominado de movimento de *spin*. Assim, o movimento de *spin* tem associado um momento angular (**a**) e um momento magnético (**μ**), sendo **μ** diretamente proporcional ao **a**. A grandeza do momento angular de *spin* é quantizada através do número quântico de *spin* (I), que depende do núcleo atômico em questão. Os núcleos ativos em RMN são aqueles com I diferente de zero e portanto são aqueles utilizados para quantificações, sendo que os núcleos ativos mencionados em cima possuem $I=1/2$. Na ausência B_0 , o momento magnético destes núcleos apresenta uma orientação aleatória (Figura 1.5). No entanto, quando os núcleos são sujeitos a B_0 , este momento magnético alinha-se com a direção do campo magnético, promovendo a distribuição dos vários *spins* nucleares segundo a distribuição de Boltzman (Figura 1.5). No caso dos núcleos com $I=1/2$, existem duas possíveis orientações, visto que os núcleos ou se alinham na direção paralela ou na direção anti-paralela de B_0 . Assim, o estado de energia dos núcleos transita entre 2 diferentes níveis, α (menor energia) e β (maior energia), respectivamente (Figura 1.5). Em suma, a espectroscopia de RMN baseia-se na absorção e reemissão de radiação eletromagnética quando um núcleo atômico, que possui **μ** e **a** diferente de zero, é exposto a um campo magnético (73).

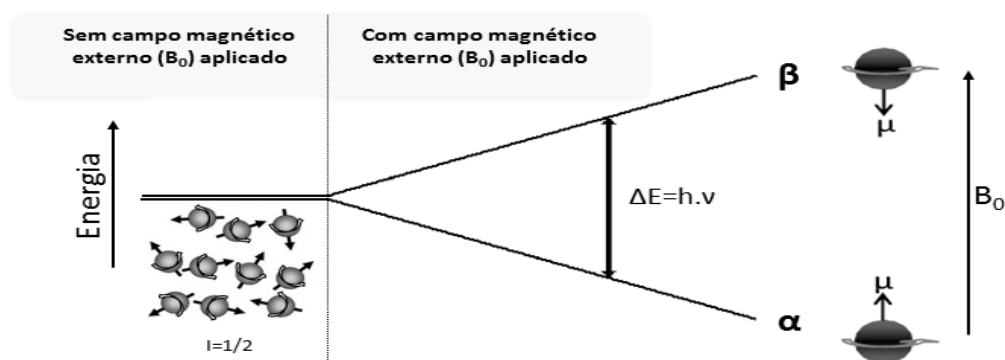


Figura 1.5 – Efeito da aplicação de um campo magnético externo (B_0) no momento magnético (μ) de um núcleo ($I=1/2$) e a consequente orientação de μ , segundo a distribuição de Boltzman ($\Delta E=h.v$), de forma paralela (α) ou anti-paralela (β) a B_0 .

O uso da espectroscopia de RMN permite obter informação sobre a estrutura química e a conformação das moléculas e, ainda, sobre os ambientes químicos que envolvem os núcleos ativos. É possível aplicar a análise por RMN em amostras líquidas (*e.g.* plasma,

urina e extratos celulares), sólidas (*e.g. pellets* celulares) ou mesmo *in vivo* (74). Esta técnica, para além de apresentar uma visão mais holística da amostra, reúne um vasto conjunto de vantagens das quais: identifica e quantifica informação numa vasta extensão de pequenas moléculas, com elevada exatidão e precisão analítica; requer uma pequena quantidade de amostra (normalmente 20 mg de tecido e 10-400 μL para amostras líquidas); apresenta elevada reprodutibilidade; não é um método destrutivo (60); permite uma deteção rápida (75); requer uma preparação simples da amostra (adição de *frequency lock signal* (*e.g.* água deuterada (D_2O) e clorofórmio (CDCl_3)), de um padrão interno (*e.g.* tetrametilsilano, TMS) e de um tampão fosfatado) (60,61). No entanto, devido à baixa diferença de energia e da população de núcleos entre os níveis de transição α e β , esta técnica apresenta uma baixa sensibilidade (μM -mM) (61,74). Normalmente, a espectroscopia de RMN está associada a uma análise não dirigida (perfil metabólico), porque permite a deteção dos variados metabolitos existentes na amostra. Tal acontece nos casos em que não há um conhecimento prévio sobre a amostra, procurando-se gerar uma hipótese (59). Uma outra vantagem da espectroscopia de RMN é o seu carácter quantitativo (qRMN), visto que a intensidade do sinal no espectro de RMN é diretamente proporcional ao número de núcleos responsáveis pela ressonância em questão. Deste modo, ao longo das duas últimas décadas, a aplicação do qRMN de ^1H tem crescido significativamente na metabolómica, pois esta técnica tem sido válida para a quantificação absoluta (em termos de precisão, exatidão, reprodutibilidade, robustez, entre outros). Contudo, a aquisição de espectros em condições quantitativas é extremamente demorada, porque é necessário que o tempo entre scans consecutivos seja de 5 vezes o tempo de relaxação T_1 mais longo, para que seja medida o máximo (99%) da magnetização.

Os espectros de RMN de ^1H (protão) unidimensionais (1D) são os mais utilizados na metabolómica, devido à sua maior rapidez de aquisição e à maior sensibilidade deste núcleo. No entanto, a resolução destes espectros é facilmente afetada pelos largos sinais da água e de solventes utilizados na extração. A presença de macromoléculas também é problemática, pois estas moléculas apresentam um baixo tempo de relaxação transversal (T_2), potenciando sinais largos, visto que o T_2 é inversamente proporcional à largura do sinal (a meia altura). Deste modo, o NOESYPR é frequentemente utilizado, pois os espectros resultantes têm uma boa supressão de solvente e uma linha de base regular (83,98). Por outro lado, a sequência de pulsos *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG) atenua

os valores de T_2 das moléculas maiores, pelo que é utilizada para diminuir a contribuição destas moléculas e resultar num espectro onde sejam facilmente visíveis os sinais das moléculas mais pequenas. A espectroscopia de difusão ordenada DOSY tem uma ação contrária ao CPMG (83,98). Devido à enorme complexidade das amostras biológicas, a sobreposição de diferentes sinais na espetrometria de RMN 1D é uma característica omnipresente, o que dificulta a identificação dos metabolitos (72,76). Para aumentar a resolução do espectro e superar este tipo de problema, usa-se a espectroscopia de RMN bidimensional (2D) (98,99,100). Contudo, esta vantagem acarreta a desvantagem da aquisição de espectros 2D ser longa, o que pode prejudicar a estabilidade das amostras, sobretudo a das biológicas (72). Deste modo, os espectros 2D são adquiridos, apenas, para analisar as amostras que sejam mais relevantes para o estudo em questão. Assim, o RMN 1D é preferível para a quantificação absoluta (94,101). Os métodos de RMN 2D mais usados são os de correlação homonuclear *J-resolved* (JRES), COSY e TOCSY e os de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC, HMQC e HMBC (76,80). Os espectros de JRES são os mais sim pois num eixo do espectro (f2) representa os desvios-químicos e no outro eixo (f1) representa os acoplamentos *spin-spin*. O COSY deteta os acoplamentos spin-spin, até ^3J da mesma molécula. O TOCSY é mais informativo que o COSY, pois deteta os acoplamentos acima de ^3J . O HSQC e o HMQC detetam acoplamentos até ^1J , a passo que o HMBC deteta acoplamentos até $^2\text{J}/^3\text{J}$ (80).

A espetrometria de massa permite determinar a razão m/z (massa/carga) pois envolve a ionização das moléculas ou dos seus fragmentos, permitindo a quantificação dos metabolitos. Esta técnica pode ser aplicada a amostras gasosas, líquidas ou sólidas, mas requer um tratamento mais extenso das amostras comparativamente à espectroscopia de RMN. Apesar de ser mais sensível que a RMN (<pM) (60), não permite medições *in vivo*, apresenta espectros de menor reprodutibilidade, é uma técnica destrutiva, apresenta um maior custo de manutenção e preparação das amostras. A espetrometria de massa está mais associada a uma análise dirigida porque, ao separar os analitos para os ionizar, há consequentemente uma seleção dos metabolitos a quantificar visto que se pretende testar uma hipótese (59).

1.2.3. Análise estatística multivariada e univariada

Na metabolómica os dados resultantes das técnicas instrumentais são abordados de duas diferentes formas, a análise multivariada (*multivariate analysis*, MVA) e a univariada (*univariate analysis*, UVA). Neste sentido, procura-se compreender quais são os metabolitos que caracterizam cada condição em estudo e quais destes é que diferem significativamente entre estas condições (81).

A análise MVA associada a resultados químicos tem a designação de quimiometria, sendo uma estratégia muito importante na metabolómica (60). Em primeiro lugar, permite reduzir a complexidade da informação obtida experimentalmente, visto que os resultados obtidos pela técnica de RMN traduzem-se numa matriz original \mathbf{X} (82). Nesta matriz encontram-se expressos os desvios-químicos (colunas) e as intensidades de todos os sinais para cada amostra (linhas), sendo que esta matriz pode ser analisada por sistemas de vetores principais (*eigensystem*). Esta abordagem permite, entre outras características, identificar padrões, que podem ser traduzidos em perfis bioquímicos (60). Os dois tipos de análise mais utilizados são a não-supervisionada e a supervisionada. A análise não-supervisionada deve ser encarada como preliminar (73), uma vez que não existe informação prévia sobre o sistema (81). Assim o agrupamento estatístico das amostras é feito com base nas suas semelhanças bioquímicas, principalmente as vias metabólicas partilhadas e os metabolitos correlacionados. A PCA (*Principal Component Analysis*) é não-supervisionada, sendo a mais utilizada pois permite a representação visual das maiores variações nos dados, sendo importante para a sua análise exploratória (74),103). As principais variações encontradas na matriz \mathbf{X} são decompostas em vetores de *scores* (\mathbf{t}) e vetores de *loadings* (\mathbf{p}) (103,104), pelo que estes vetores correspondem aos componentes principais de variação (Figura 1.6). O primeiro vetor de *scores* e *loadings* a ser extraído é aquele onde a variação é maior e assim sucessivamente (83). Deste modo, o gráfico de dispersão (*scatter plot*) dos 2 primeiros vetores de *scores* (\mathbf{t}_1 e \mathbf{t}_2) fornece uma visão geral das variações na amostra (Figura 1.6). Desta forma, torna-se mais fácil a perceção de aglomerados de padrões e amostras atípicas (*outliers*). O gráfico dos *loadings* realça o peso individual de cada variável da matriz \mathbf{X} (Figura 1.6) (83).

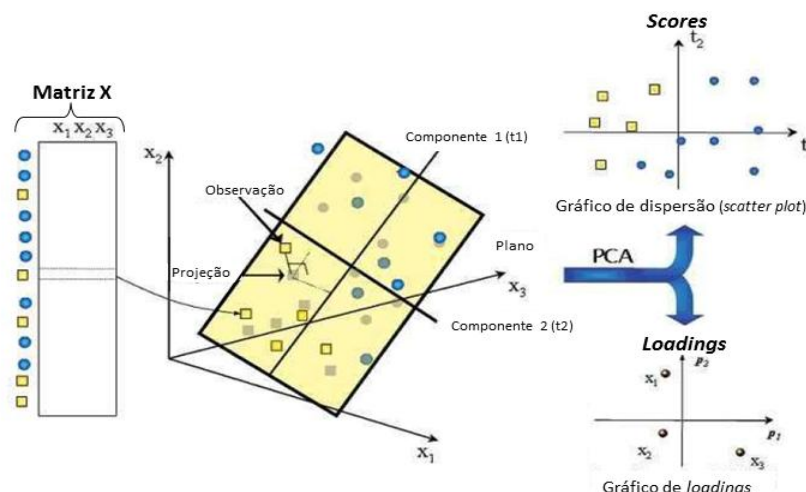


Figura 1.6 – Representação da análise não-supervisionada PCA, a partir da matriz **X** dos dados originais e provenientes da análise analítica das amostras (figura adaptada de (82)).

A análise supervisionada é aplicada para evidenciar diferenças bioquímicas entre as classes pré-estabelecidas (73). Estas classes são definidas em função do pré-conhecimento do sistema. Este tipo de análise permite uma classificação mais diferencial e previsível, pelo que costuma ser utilizada para determinar biomarcadores (74). Um dos procedimentos mais utilizados é a análise de PLS-DA (*Projection to Latent Structures – Discriminant Analysis*). Este tipo de análise relaciona a matriz **X** com um vetor (**y**) ou com uma matriz **Y** (Figura 1.7, A.1 e A.2, respetivamente), onde se encontra discriminada a informação qualitativa das amostras, no caso de serem selecionadas 2 ou mais classes em estudo, respetivamente (81,84). A relação quantitativa é feita através de um modelo de regressão parcialmente linear, pelo que é possível obter certas figuras-de-mérito, R^2 e Q^2 , para avaliar a robustez do modelo construído. Os valores de ambos os parâmetros variam entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1 se situar o Q^2 mais preditivo e robusto será o modelo (81). Por outro lado, a análise OPLS-DA (*Orthogonal Projection to Latent Structures – Discriminant Analysis*) tem sido cada vez mais utilizada em estudos metabolómicos. Esta análise é uma modificação do modelo PLS-DA e consiste na separação ortogonal da informação, que está relacionada com a hipótese *a priori* (expressa em **y** ou **Y**) (85). Neste sentido, separa as variações parcialmente lineares e as variações ortogonais entre **X** e **Y** (**y**), promovendo uma interpretação mais fácil das variações obtidas em comparação com os modelos desenvolvidos por PLS-DA (81,83,85). Visualmente, o modelo OPLS-DA parece resultar numa rotação do modelo PLS-DA (Figura 1.7, B) (85).

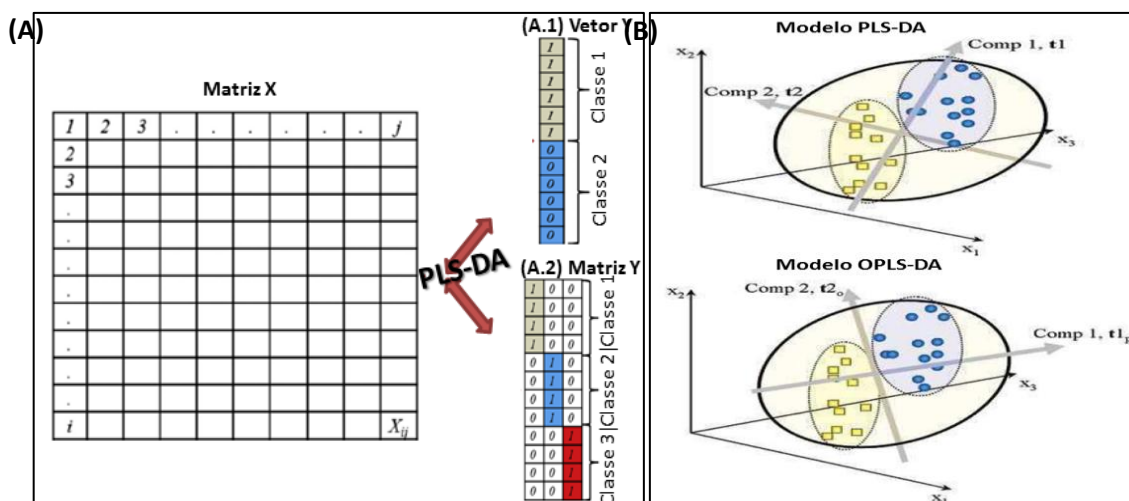


Figura 1.7 - Representação da análise supervisionada PLS-DA, através da relação entre a matriz **X** dos dados originais e o vetor **Y** (A.1) ou a matriz **Y** (A.2) dos dados qualitativos das amostras, considerando 2 ou mais classes de estudo, respectivamente (A). Representação da análise OPLS-DA a partir da rotação diagonal da análise PLS-DA (B) (figura adaptada de (82)).

Depois de identificado o conjunto de metabolitos que caracteriza cada classe em estudo e de identificados quais os responsáveis pelas principais diferenças entre condições, pode ser útil aplicar a análise UVA aos dados. Esta análise é usada para avaliar quais dos metabolitos identificados são estatisticamente significativos. Os estudos metabolômicos utilizam diversos testes estatísticos, dos quais se destaca o teste-t de *Student* em ambas as suas vertentes, paramétrica (teste de Welch) e não paramétrica (teste de Wilcoxon). O teste de Welch permite testar a hipótese de que dois grupos amostrais diferentes possuem igual média, sendo aplicado a grupos com diferentes valores de variância e tamanho da amostra (86). O teste de Wilcoxon é usado quando as mostras são emparelhadas e seguem uma distribuição não normal. O resultado é usualmente expresso para um intervalo de confiança de 95%, sendo, a significância estatística, reportada por intermédio do valor de p (p -value). O p -value representa a probabilidade de se rejeitar erradamente a hipótese nula considerada, sendo afetado pelo tamanho do grupo amostral (saber se a significância estatística deriva do acaso ou não). Deste modo, um grupo com maior número de amostras, *à priori*, apresenta um valor de p mais significativo que um grupo mais pequeno (87,88). Este é um dos parâmetros mais utilizado para avaliar a significância estatística de diversos estudos (88). No entanto, a avaliação da magnitude de diferenças (*effect size*, ES) deve ser igualmente realizada, pois não é afetada pelo tamanho do grupo amostral e permite determinar a correlação entre as variáveis em estudo (*e.g.* significância clínica de um

determinado tratamento sob a progressão de uma dada doença) (87,88). Assim, o ES é definido como a magnitude da diferença entre 2 grupos em relação a um atributo de interesse e pode ser estimado através de diferentes métodos, sendo que o mais utilizado baseia-se na diferença de médias entre grupos. O ES é também importante para a meta-análise, pois permite comparar quantitativamente a tendência (força e direção) entre variáveis de diferentes estudos (88).

1.3. Estado de arte: estudos metabolómicos em humanos e estudos metabólicos em murganhos transgénicos KRAS e MYC com cancro pancreático

A metabolómica é uma estratégia que tem vindo a ser utilizada no estudo do perfil metabólico do PDAC e também da pancreatite. Deste modo, serão brevemente descritos os estudos em humanos e posteriormente serão descritos, com maior detalhe, os estudos em murganhos, visto que o presente trabalho incide sobre o perfil metabólico de murganhos.

1.3.1. Humanos

Em humanos, os estudos metabolómicos recorrem sobretudo à análise de biofluidos, sendo que o soro e o plasma são a matriz amostral mais utilizada (63,89-94), seguindo-se a urina (95,96) e o líquido biliar (97). Todos estes estudos procuram possíveis metabolitos que caracterizem distintamente o PDAC e que possam ser possíveis biomarcadores metabólicos. Para tal, compararam o perfil metabólico dos pacientes de PDAC com o de indivíduos controlos (63,89,90,92,94-97), com complicações hepatobiliares benignas (*e.g.* pseudoquistos, cistadenomas, pancreatite, entre outras) (91) e com pancreatite crónica (*chronic pancreatitis*, CP) (93). Os estudos utilizaram a espectroscopia de RMN de ^1H e a espetrometria de massa (acoplada a outras técnicas, como a cromatografia líquida e/ou gasosa, ionização por eletrospray (ESI) e *time of flight* (TOF)) e aplicaram a MVA (PCA, PLS-DA e/ou OPLS-DA) para analisarem o perfil metabólico das classes em estudo. Na Tabela 1.1. encontram-se discriminados os metabolitos que se encontravam a variar significativamente ($p\text{-value}<0.05$) entre os grupos em estudo, sendo que as variações representadas dizem respeito ao grupo dos indivíduos com PC desenvolvido.

Tabela 1.1 – Principais alterações do perfil metabólico de biofluidos de indivíduos com PC.

Biofluido	Técnica analítica	Principais variações metabólicas	Ano	Ref.
Soro ou Plasma	RMN de ¹ H LC-MS	↑ Lípidos saturados e insaturados, -OH dos esteróis alifáticos, colesterol e ácidos biliares ↓ Fosfatidilinositóis e fosfatidilgliceróis	2006	(98)
	GC-MS	↑ Lactato, tioglicolato, 7-hidroxoctanolato, asparagina, aconitato, ácido, N-acetil tirosina ↓ Glicina, ureia, octanolato, glicerato, decanoato, dodecanolato, tetradecanolato, pamitato, margarato, estearico	2010	(89)
	GC/TOF-MS LC/ESI-MS	↑ Ácido araquidônico, eritrol, colesterol, N-metilalanina, lisina, desoxicoliglicina, coliglicina, fosfocolina, fosfoetanolamina, ácido tauroursodesoxicólico e ácido taurocólico ↓ Glutamina, fenilalanina, triptamina, inosina, ácido hidroxicinâmico	2010	(90)
	RMN de ¹ H	↑ Creatina, glutamina, prolina, glicerol, 4-piridoxato, etanol, asparagina, ureia, metanol, treonina, triptofano, lisina ↓ Dimetilamina, arginina, 3-metil-2-oxovalerato, manose, 3-hidroxi butirato, formato, fenilalanina, acetona, glucose, glutamato	2011	(91)
	RMN de ¹ H	↑ Isoleucina, leucina, creatinina, triglicerídeos ↓ 3-hidroxi-isobutirato, 3-hidroxi-isovalerato, lactato, TMAO	2011	(92)
	RMN de ¹ H	↑ N-acetil glicoproteína, dimetilamina, VLDL, acetona ↓ 3-hidroxi butirato, lactato, HDL, LDL, citrato, alanina, glutamina, glutamato, histidina, isoleucina, lisina e valina	2012	(93)
	GC-MS LC-MS	↑ Metilguanidina, glutamato, N-acetilglutamina, talopirano, ácido glicocólico, ácido 2-oxoglutárico, ácido 2-metil-3-oxopropanóico ↓ Ureia, colina, creatinina, 3-amino-2-piperidona, betaína, valina, ácido 2,4-diaminobutírico, glutamina, triptofano, prolina, ácido indolacético, ácido 1,3,7-trimetilurico, ácido úrico, ácido indolacrílico, adenina, ácido mono-isobutil ftálico, ácido 2,5-hidroxibenzóico, ácido 2-hidroxicinâmico, 1,5-anidro-D-glucitol, propionilcarnitina, galactitol, ácido nitotínico	2015	(94)
Urina	RMN de ¹ H	↑ Acetoacetato, compostos acetildos, glucose, Citrato, creatinina, glicina, 3-hidroxi-isovalerato, leucina, 2-fenilacetamida, trigolina ↔ Adenina, alanina, sais biliares, formato, 2-hidroxi-isobutirato, 4-hidroxifenilacetato, isobutirato, lactato, dimetilamina, TMAO, 3-metilhistidina, 1-metilnicotinamida, valina	2011	(95)
	RMN de ¹ H	↑ Acetona, hipoxantina, o-acetilcarnitina, dimetilamina, colina, 1-metilnicotinamida, treonina, fucose, cis-aconitato, 4-piridoxato, glucose, TMAO, aminobutirato, triptofano, xilose, trans-aconitato, 4-hidroxifenilacetato, taurina ↓ Trigolina, metanol	2013	(96)
Líquido Biliar	RMN de ¹ H	↑ Ácido D-glucurônico	2009	(97)

Na maior parte dos estudos verificou-se uma alteração do metabolismo de aminoácidos, ácidos orgânicos e lípidos. No entanto, verifica-se uma variabilidade do perfil metabólico entre os diferentes indivíduos dos diferentes estudos, pois verificam-se variações contrárias em alguns casos, como por exemplo, glutamina, prolina, lisina, isoleucina, ureia, glutamato, creatinina, entre outros. Esta variabilidade poderá resultar do facto dos pacientes apresentarem estadios tumorais diferentes, do facto de estarem sujeitos a fatores externos diferentes (*e.g.* dieta e fatores ambientais) e fatores de confusão diferentes (*e.g.* idade, género, entre outros). Relacionado o metabolismo dos aminoácidos encontra-se um outro estudo, não mencionado na tabela, o qual demonstrou que o aumento de aminoácidos ramificados no plasma sanguíneo (BCAAs) está relacionado com o diagnóstico futuro de PC (99). Assim, parece que a degradação proteica é um evento precoce no desenvolvimento deste tipo de cancro. Ainda relativamente aos biofluidos, um outro estudo, que utilizou GC-MS/MS para analisar o perfil do soro de pacientes com cancro pancreático, propôs dois possíveis modelos de biomarcadores e comparou a sua especificidade com o marcador CA 19.9. O primeiro modelo, modelo ‘X’, era constituído pela histidina, inositol, xinitol e 1,5-anidro-D-glucitol e apresentou uma sensibilidade e uma especificidade de 81.3% e 87.5%, respetivamente (Figura 1.8). Por outro lado, o segundo modelo, modelo ‘Y’, era constituído pela histidina e xinitol e apresentou uma sensibilidade e uma especificidade de 75.0% e 100.0% (Figura 1.8). Comparativamente a ambos os modelos, os níveis de ambos os parâmetros eram mais baixos no caso do marcador CA 19.9, sendo que a sensibilidade era de 75.0% e a especificidade de 81.3% (Figura 1.8). Contudo, quando combinados os modelos com este marcador, os níveis de ambos os parâmetros alteravam-se: o nível de especificidade do primeiro modelo aumentou, passando a ser 93.8% (Figura 1.8); o nível de sensibilidade do segundo modelo aumentou, mas a especificidade diminuiu ligeiramente, passando a ser 83.3% e 93.8%, respetivamente (Figura 1.8). Assim, os autores observaram que os seus modelos propostos apresentavam uma maior sensibilidade que o CA 19.9, pelo que concluíram que o uso combinado de metabolitos seleccionados e de CA 19.9 poderá ser uma estratégia de maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico precoce de PC. Contudo, há a necessidade de serem testados estes modelos num grupo amostral de maiores dimensões.

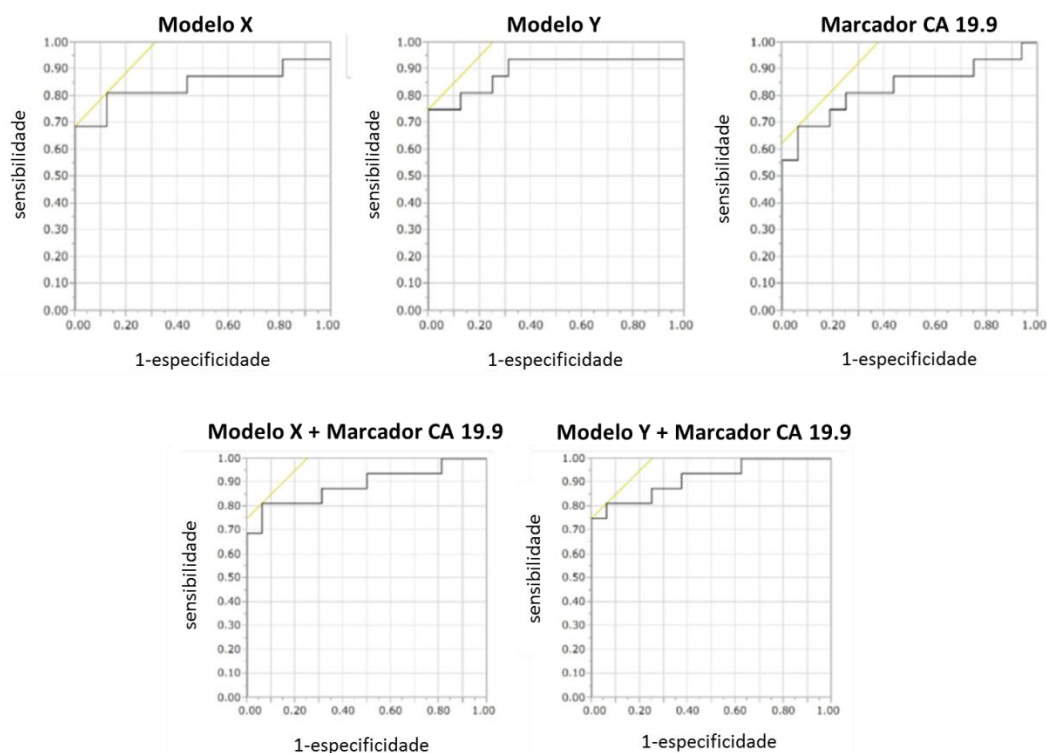


Figura 1.8 – Especificidade e sensibilidade de modelos de biomarcadores séricos propostos para o diagnóstico de cancro pancreático de forma individual e combinados com o biomarcador tumoral CA 19.9 (modelo ‘X’ era constituído pela histidina, inositol, xinitol e 1,5-anidro-D-glucitol e o modelo ‘Y’ pela histidina e xinitol).

O tecido pancreático de pacientes com PC e de indivíduos saudáveis foi analisado por MS/MS acoplada a cromatografia líquida de alta performance e verificou-se que o perfil metabólico dos dois tipos de tecidos variava em 55 metabolitos. Destes 55 metabolitos, 8 ácidos gordos revelaram-se como sendo relevantes, o que salientou o facto do metabolismo lipídico se encontrar alterado no PDA. Assim, a diminuição dos ácidos gordos margarato, esteárico, 10-nonadecanoato, eicosanoato, linoleato, oleato, palmitato e linolenato é coerente com a diminuição da expressão genética de lípases, enzimas envolvidas na degradação de lípidos mais complexos. Não foram encontrados mais estudos que analisassem o tecido pancreático, muito provavelmente devido ao facto da recolha deste tipo de amostra ser muito invasiva.

1.3.2. Murganhos KRAS

Os estudos sobre o PC utilizam frequentemente um tipo de GEEM que visa a ativação contínua do KRAS (LSL-KRAS), pois a progressão do PDAC nos humanos é

fielmente reproduzida, comparativamente a outros modelos (100). Este mesmo modelo foi, também, usado em estudos que incidiam sobre o cancro pulmonar (101–105). Contudo, os estudos mencionados de seguida centram-se unicamente no PC, uma vez que este tipo de tumor representa o foco desta tese de mestrado. Deste modo, os estudos são descritos por ordem cronológica, sendo que inicialmente, serão abordados três estudos que avaliam alterações metabólicas específicas no tecido pancreático de murganhos transgênicos (4,106,107) e, posteriormente, dois estudos metabolômicos que analisam todo o perfil metabólico do soro e do tecido pancreático de murganhos transgênicos (108,109).

Um dos estudos metabólicos analisou a expressão do transportador de glucose GLUT-2 em pâncreas de murganhos transgênicos, através de métodos imunohistoquímicos (106). Verificou-se que a expressão de GLUT-2 ocorria nas lesões PanIN em estádios mais avançados. Assim, o transportador GLUT-2 encontrava-se expresso em 85% das células com lesões PanIN-1 (no estadio final de desenvolvimento), PanIN-2 e -3. Estes resultados foram confirmados em humanos, onde 45 em 60 indivíduos apresentavam o GLUT-2 expresso a partir do estadio final das lesões PanIN-1. Neste sentido, os autores mencionaram que o aumento do fluxo do metabolismo da glucose é um processo precoce no desenvolvimento tumoral e que pode permitir a deteção das lesões precursoras do PDAC (106). Um segundo estudo utilizou murganhos transgênicos com o PDAC já desenvolvido para verificar as alterações metabólicas que ocorriam após o oncogene KRAS deixar de ser continuamente expresso, devido à privação do fármaco doxiciclina (107). Neste estudo, as alterações mais significantes ocorreram em metabolitos intervenientes na glicólise aeróbia, nomeadamente, glucose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, frutose-1,6-bisfosfato e lactato, pelo que o consumo de glucose e a produção de lactato diminuíram. Como tal, verificou-se uma diminuição na expressão do transportador de glucose GLUT-1 e das enzimas hexocinase-1 e -2, fosfofrutocinase-1 e lactato desidrogenase (Figura 1.9, A). Por outro lado, o fluxo do ciclo TCA não sofreu alterações com a inativação do oncogene KRAS. Quanto à via HBP, os níveis de glucosamina-6-fosfato e a expressão da enzima glucosamina-frutose-6-fosfato transaminase (Figura 1.9, B) também diminuíram, o que se comprovou pela diminuição da O- e N-glicosilação pós-traducional de proteínas. A via PPP também foi afetada pela inativação do KRAS, visto que se verificou uma diminuição significativa nos níveis de sedoheptulose-7-fosfato. Através da marcação $^{13}\text{C}_6$ -glucose verificou-se que os níveis dos metabolitos ribose-5-

fosfato, sedoheptulose-7-fosfato e eritrose-4-fosfato, relacionados com a fase não oxidativa, diminuía, (Figura 1.9, C), sendo que o fluxo da fase oxidativa não sofreu alterações. Os autores demonstraram que o abrandamento da fase não oxidativa da via PPP e a consequente diminuição da produção de ribose-5-fosfato promoveu uma diminuição na biossíntese de DNA/RNA. Assim, verificou-se que a fase não oxidativa da via PPP apresenta um fluxo exacerbado durante o desenvolvimento do PDAC, pois as células tumorais, ao dividirem-se continuamente, necessitam de ribose-5-fosfato disponível para a ativação da biossíntese de ácidos nucleicos. Os níveis de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) não se alteraram significativamente. Para terminar, após 1 semana de inativação do oncogene KRAS, os autores verificaram que os tumores começaram a regredir. Deste modo, salientou-se a dependência do desenvolvimento tumoral com as alterações metabólicas potenciadas pelo oncogene KRAS (107). Por último, um outro estudo analisou extratos aquosos de tecidos pancreáticos de murganhos transgênicos para investigar alterações metabólicas e/ou enzimáticas (4). Assim, através de métodos de imagem, observou-se um aumento do consumo da fluorodesoxiglucose (marcada com o isótopo 18 de flúor) nas células afetadas com lesões PanIN e PDAC, o que refletiu o aumento do consumo da glucose nestas mesmas células. Concordantemente, verificou-se que a expressão dos transportadores de glucose GLUT-1 e -3 e das enzimas hexocinase-1 e -2 era maior no tecido pancreático de murganhos transgênicos do que nos controlo. Através de ensaios enzimáticos, verificou-se que a razão da atividade enzimática alanina aminotransferase/lactato desidrogenase diminuía com a progressão das lesões PanIN. Consequentemente, a razão da concentração alanina/lactato também diminuía, visto que a concentração de lactato aumentava, o que refletia um aumento do fluxo da glicólise aeróbia. Estes resultados foram corroborados com o uso de ressonância magnética de imagem (com ^{13}C -piruvato hiperpolarizado), observando-se, *in vivo*, a mesma magnitude de diminuição na razão da atividade enzimática e na razão da concentração dos metabolitos, com a progressão da patologia. Deste modo, através da razão da concentração ^{13}C -alanina/ ^{13}C -lactato, os autores conseguiram distinguir os vários estadios das lesões PanIN do PDAC e, ainda, da pancreatite (4).

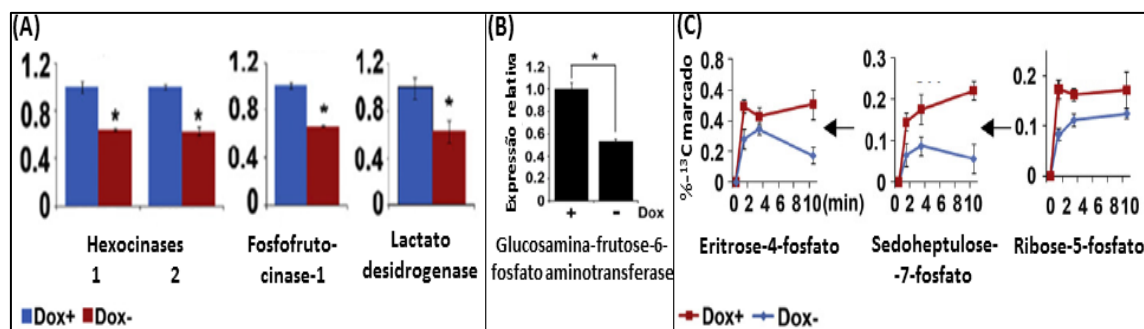


Figura 1.9 – (A) Expressão relativa das enzimas envolvidas na glicólise, em murganhos transgênicos, que diminuíram significativamente ($p < 0.05$, assinalado com *) devido à privação do fármaco doxíciclina (DOX) (B) Expressão relativa da enzima glucosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase, envolvida na via HBP, em murganhos transgênicos: a inibição do oncogene KRAS promove a diminuição significativa ($p < 0.05$, assinalado com *) da enzima; (C) Percentagem de ¹³C marcado em metabolitos da fase não oxidativa da via PPP, em murganhos transgênicos: a inibição do oncogene KRAS (linha azul) diminui o fluxo desta via metabólica, pelo que se verificou uma diminuição da eritrose-4-fosfato, da sedoheptulose-7-fosfato e da ribose-5-fosfato (figura adaptada de (107)).

Os estudos metabolómicos representam uma abordagem mais vantajosa que os estudos metabólicos, visto que a metabolómica procura detetar e quantificar os metabolitos existentes numa dada amostra biológica, através de uma visão holística de todo o perfil metabólico (59). Deste modo, nos estudos metabolómicos, foi utilizada a espetrometria de massa para analisar o soro (108,109) e o tecido pancreático (108) de GEMMs KRAS^{G12V} (108) e KRAS^{G12D} (109). As mutações do oncogene KRAS destes GEMMs são as mais comuns, conforme foi mencionado inicialmente. Em ambos os estudos realizados foi possível observar uma clara separação do perfil metabólico do soro e do tecido dos murganhos transgênicos relativamente aos murganhos controlo, nos dois tipos de amostras utilizados (108,109) (Figura 1.10, A). Com a análise do soro, os autores observaram que esta separação se tornava mais clara com a progressão das lesões PanIN (109). Os perfis metabólicos do soro e do tecido eram distintos em cada grupo e entre grupos de murganhos (108). No soro, dos murganhos transgênicos, estavam significativamente aumentados o ácido aminomalónico, o 2-aminoetilo dihidrogenofosfato, o citrato e a lantionina. No tecido pancreático, dos murganhos transgênico, FAs como o linoleico, octadecanóico, mirístico e hexadecanóico encontravam-se significativamente diminuídos. Este fenómeno é discordante com o facto da maioria dos tumores apresentarem uma exacerbada produção de FA, para os utilizarem na síntese de membranas celulares das novas células, conforme mencionado anteriormente. O único metabolito concordante entre os dois tipos de amostras

usados foi o ácido palmitoleico, que se encontrava significativamente (valor de $p < 0.05$) diminuído nos murganhos transgénicos relativamente aos murganhos controlo, sendo a diminuição maior no tecido pancreático. Desta forma, o ácido palmitoleico parece ser um possível candidato a biomarcador para o diagnóstico do PDAC. O ácido araquidónico e a 2(1*H*)-pirimidinona também eram metabolitos concordantes entre amostras, pois encontravam-se ambos diminuídos no soro e no tecido de murganhos transgénicos, contudo diminuía de forma não significativa e significativa, respetivamente. Além disso, identificaram-se alguns metabolitos relacionados com a glicólise e o ciclo TCA, os quais não diferiam significativamente entre murganhos transgénicos e controlo, quer no soro, quer no tecido pancreático. Nos murganhos transgénicos, a expressão de algumas enzimas intervenientes na glicólise aeróbia e na degradação de purinas e pirimidinas encontrara-se aumentada, contrariamente à diminuída expressão de enzimas intervenientes no ciclo TCA. Genericamente, este estudo sugere uma ativação da atividade da glicólise aeróbia e uma supressão do ciclo TCA. No entanto, não foi notório o efeito de Warburg nos murganhos transgénicos, devido, possivelmente, ao facto do desenvolvimento do PDAC ter ocorrido em apenas 2 semanas. Assim, os autores sugeriram que flutuações nos FAs deverão ocorrer em indivíduos com estadios tumorais menos avançados, ao passo que, metabolitos como a glucose e o lactato possam sofrer flutuações notórias em estadios mais avançados (108). No outro estudo metabolómico, o único metabolito estatisticamente significativo (valor de $p < 0.05$), a variar entre condições, foi o citrato (109). Assim, a concentração do citrato no soro era menor nos murganhos controlo, aumentava com o aumento da idade de qualquer tipo de rato e também aumentava com a progressão da patologia, nos murganhos transgénicos (Figura 1.10, B). Os autores usaram a imunohistoquímica para comprovarem estes resultados, uma vez que demonstraram que a expressão da enzima citrato sintase era maior nos murganhos transgénicos do que nos controlo. Deste modo, os autores sugeriram que o citrato poderia representar um possível biomarcador do PDAC, uma vez que o aumento da expressão da enzima citrato sintase derivava do aumento do metabolismo resultante da transformação celular maligna (109).

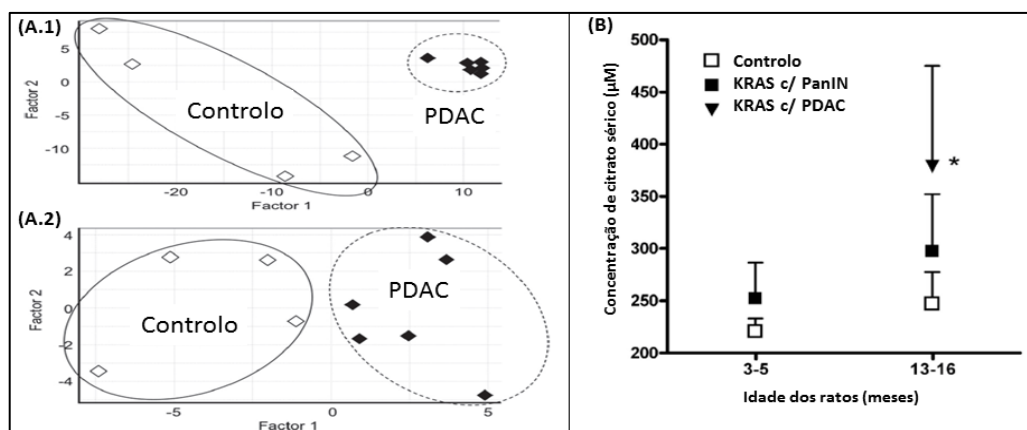


Figura 1.10 – (A) Análise não supervisionada *Principal Component Analysis* (PCA) do perfil metabólico de amostras de tecido pancreático (A.1) e do soro (A.2), de murganhos controlo e transgénicos com o oncogene KRAS modificado, analisadas por espetrometria de massa (figura adaptada de (108)); (B) Concentração sérica de citrato em murganhos controlo e transgénicos: a concentração é menor nos murganhos controlo, aumenta com a idade dos murganhos e aumenta significativamente ($p < 0.05$, assinalado com *) com a progressão da patologia (PanIN-PDAC) (figura adaptada de (109)).

1.3.3. Murganhos MYC

O oncogene MYC é igualmente importante para o desenvolvimento e progressão do PC, conforme mencionado anteriormente. Todavia, não foram encontrados estudos nos correspondentes GEMMs, que avaliem alterações metabólicas em murganhos com PC. Existem dois estudos que relacionam a sobre-expressão do oncogene MYC com o metabolismo de células hepáticas tumorais de murganhos transgénicos (110,111). Salienta-se, ainda, um estudo do perfil metabólico de murganhos transgénicos com neuroblastoma (112).

Um dos estudos hepáticos baseou-se na comparação dos extratos de tecido hepático de murganhos controlo com murganhos transgénicos, que possuíam o oncogene MYC sobre-expresso, através da administração do fármaco doxíciclina (110). Em primeiro lugar, verificaram-se menores níveis de glucose nos murganhos transgénicos comparativamente aos murganhos controlo (Figura 1.11, A). Este fenómeno foi concordante com a maior atividade das enzimas hexocinase-2 e fosfofrutocinase-1 e, portanto, com o maior fluxo da glicólise nos murganhos transgénicos. Por outro lado, verificou-se que a expressão da enzima glucose-6-fosfatase era menor nos murganhos transgénicos, pelo que os autores sugeriram que as alterações no oncogene MYC podem resultar num possível défice na biossíntese de glucose. Em segundo lugar, verificou-se que a concentração de lactato era maior nos murganhos transgénicos do que nos controlo (Figura 1.11, B.1). Estes resultados

foram comprovados pela maior atividade total da enzima lactato desidrogenase e pela maior expressão da sua subunidade A, nos murganhos transgênicos (Figura 1.11, B.2). Deste modo, os autores mostraram que o catabolismo da glucose está relacionado com o aumento da biossíntese de lactato, visto que, ao ser utilizada a marcação ^{13}C -glucose, os níveis de ^{13}C -lactato aumentaram nas células hepáticas tumorais (Figura 1.11, C). Ainda neste estudo, através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), verificou-se que os níveis de glutamina diminuía drasticamente de murganhos controlo para transgênicos (Figura 1.11, D.1). Esta diminuição foi justificada pela atividade das enzimas glutamina sintase (*glutamate-ammonia ligase*, GLUL) e glutaminase (*glutaminase*, GLS) dependente de fosfato. A GLUL, responsável pela biossíntese da glutamina a partir da ligação entre a amónia e o glutamato, apresentou uma atividade diminuída, ao passo que a GLS dependente de fosfato, responsável pela conversão de glutamina em glutamato, apresentou uma atividade aumentada (Figura 1.11, D.2). Os autores sugeriram que a biossíntese de glutamina se encontrava diminuída devido ao efeito das alterações no oncogene MYC na atividade das enzimas, anteriormente mencionadas. Contudo, de forma a permitir o elevado fluxo do catabolismo da glutamina necessário às células tumorais, o transporte deste metabolito deverá ser facilitado pelo transportador Slc1a5. Quanto ao ciclo TCA, observou-se que os níveis de alguns metabolitos se encontram aumentados, nomeadamente, o fumarato, o malato, o citrato, o glutamato e o aspartato. Deste modo, o catabolismo da glucose e da glutamina mostrou ser responsável por este aumento do fluxo do TCA, visto que, com a marcação ^{13}C -glucose ou ^{13}C -glutamina, se verificou um aumento no ^{13}C -citrato, ^{13}C -glutamato e ^{13}C -aspartato. É de salientar que a marcação ^{13}C -glutamina resultou, ainda, no aumento de ^{13}C -lactato, todavia, os autores desconhecem o possível mecanismo através do qual este fenómeno ocorra. Para terminar, estes autores confirmaram que as alterações metabólicas anteriormente referidas não são totalmente comuns a GEMMs de cancro pulmonar (110). Assim, num grupo diferente de murganhos transgênicos e com cancro pulmonar, a sobre-expressão do oncogene MYC promoveu igualmente o aumento da expressão das enzimas hexocinase-2, da lactato desidrogenase e da GLS dependente de fosfato. Em contra partida, observaram-se níveis mais elevados de glutamina nos murganhos transgênicos de cancro pulmonar do que nos de cancro hepático, devido à maior atividade da enzima GLUL no primeiro tipo de cancro (110). Salienta-se que, no entanto, estes resultados não foram confirmados pelo outro estudo hepático (111),

no qual se verificou que a inativação do oncogene MYC não alterava o nível de transcrição dos genes envolvidos na regulação do metabolismo da glucose e da glutamina em murganhos transgénicos.

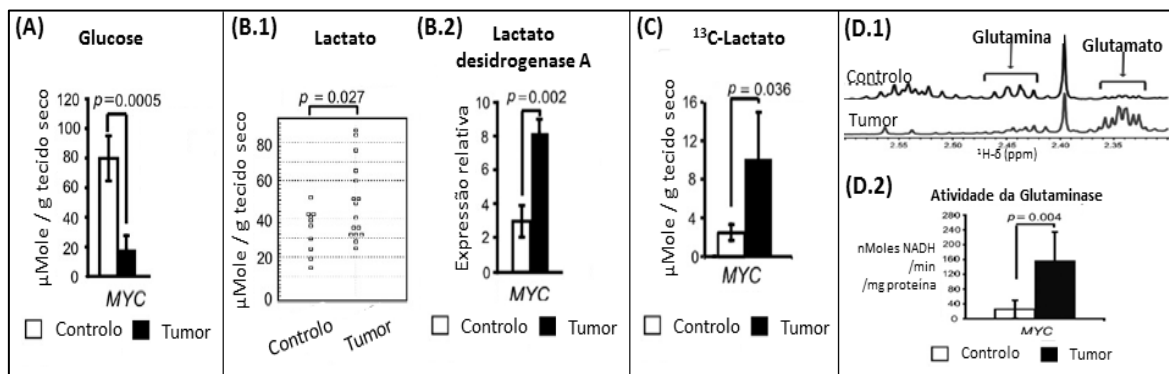


Figura 1.11 – Alterações metabólicas provocadas pela sobre-expressão do oncogene MYC em murganhos transgénicos com tumor hepático desenvolvido (barras pretas) comparativamente a murganhos controlo (barras brancas) **(A)** Concentração de glucose no tecido hepático de ambos os grupos de murganhos: diminuição significativa ($p < 0.05$) nos murganhos transgénicos; **(B.1)** Concentração de lactato no tecido hepático de ambos os grupos de murganhos: aumento significativo ($p < 0.05$) nos murganhos transgénicos; **(B.2)** Expressão relativa da enzima lactato desidrogenase A em ambos os grupos de murganhos: aumento significativo ($p < 0.05$) nos murganhos transgénicos **(C)** Concentração de ^{13}C -lactato, resultante da marcação de ^{13}C -glucose, no tecido hepático de ambos os grupos de murganhos: aumento significativo ($p < 0.05$) nos murganhos transgénicos; **(D.1)** Espectro de RMN de próton (^1H) exemplo de cada um dos grupos de murganhos, normalizado pela massa de tecido seco: diminuição da intensidade do sinal da glutamina (região 2.42-2.47 ppm) e aumento da intensidade do sinal do glutamato (região 2.32-2.37 ppm) nos murganhos transgénicos; **(D.2)** Atividade da enzima glutaminase em ambos os grupos de murganhos: aumento significativo ($p < 0.05$) nos murganhos transgénicos (figura adaptada de (110)).

O estudo que incidiu sobre o neuroblastoma procurou compreender a diferença no perfil metabólico de murganhos transgénicos portadores de lesões pré-malignas e de neuroblastoma *in situ* comparativamente a murganhos controlo (112). Para tal, analisaram-se os extratos aquosos do tecido dos gânglios do sistema nervoso simpático dos murganhos, através de espectrometria de massa. Assim, verificou-se que os metabolitos identificados estavam maioritariamente aumentados nos murganhos transgénicos com neuroblastoma. A maior parte destes metabolitos relacionava-se com o metabolismo da glutatona, sendo que os autores salientaram o facto da glutatona ser um antioxidante importante para prevenir o *stress* oxidativo a que as células tumorais estão sujeitas. Dos vários metabolitos identificados, os níveis de sete, relacionados com o metabolismo da glutatona, aumentaram com a evolução tumoral: glicina, cisteína, glutamato, glutamina, 5-

oxoprolina, dissulfeto de cisteína-glutationa, glutatona (Figura 1.12). Deste modo, estudou-se a expressão das possíveis enzimas envolvidas nestes processos metabólicos, tendo-se verificado, contudo, que a expressão das enzimas encontrava-se diminuída. Assim, os autores sugeriram que o aumento verificado na via da biossíntese da glutatona não residia no aumento da transcrição das enzimas chaves. Além disso, verificou-se que o fluxo de outras vias encontrava-se igualmente aumentado, particularmente, o das vias que integram o metabolismo do glutamato, da glicina e da cisteína, pelo que os autores justificaram este aumento com a possível necessidade celular na obtenção de substratos para a biossíntese de glutamina. Para terminar, os autores sugeriram que vias relacionadas com o ciclo celular, a reparação do DNA e a biossíntese de ribossomas se encontravam também aumentadas devido à sobre-expressão do oncogene MYC (112).

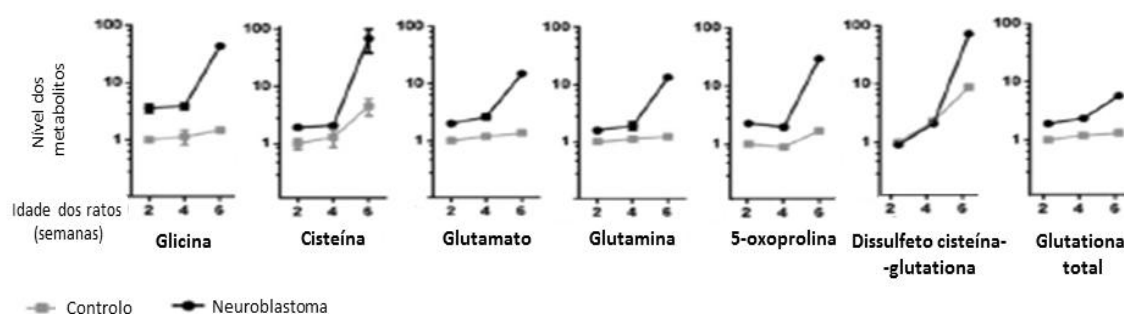


Figura 1.12 – Aumento do nível de alguns metabólitos intervenientes no metabolismo da glutatona, potenciado pela sobre-expressão do oncogene MYC em murganhos transgénicos com neuroblastoma desenvolvido (linha preta), comparativamente a murganhos controlo (linha cinzenta) (figura adaptada de (112)).

Conforme se verificou, estudos sobre alterações metabólicas no cancro pancreático, usando modelos de murganhos transgénicos com os oncogenes KRAS e MYC modificados, são pouco frequentes. Além disso, o uso da metabolómica nestes estudos é menos frequente, sendo que das duas técnicas instrumentais de análise mais utilizadas, espetrometria de massa e espetroscopia de RMN, os estudos recorreram, apenas, à primeira técnica. Neste sentido, o trabalho no âmbito da minha tese de mestrado enquadra-se de forma pertinente na bibliografia atual, recordando que se recorreu à metabolómica por espetroscopia de RMN de ^1H para analisar extratos aquosos e lipídicos de tecido pancreático de murganhos transgénicos.

2. Materiais e métodos

2.1. Grupos de murganhos transgênicos em estudo

Este trabalho realizou-se em parceria com investigadores da Universidade de Cambridge (grupo do Professor Kevin Brindle), onde se elaborou toda a parte de manipulação dos murganhos, protocolo de injeção, excisão do pâncreas e preparação dos extratos aquosos e lipídicos. A primeira parte do trabalho envolveu o estudo do efeito do oncogene KRAS no desenvolvimento e progressão da pancreatite e do cancro pancreático, dando continuidade a trabalho previamente realizado, nomeadamente a aquisição de espectros de RMN de ^1H de extratos aquosos de pâncreas de murganhos (4). Esta tese contribuiu para a análise dos espectros, através de estatística multivariada e univariada. A segunda parte do trabalho envolveu o estudo da ativação do oncogene MYC no metabolismo de murganhos. Este efeito envolveu a ativação isolada deste oncogene e a ativação conjunta do mesmo com o oncogene KRAS, dado haver indicações que a ativação destes oncogenes pode promover a carcinogénese (114). Para tal, analisou-se o perfil metabólico de murganhos, através da análise de extratos aquosos e lipídicos de pâncreas destes animais, por espectroscopia de RMN. A aquisição dos espectros de RMN de extratos aquosos realizou-se na Universidade de Cambridge, sendo que, no âmbito desta tese, procedeu-se à análise destes espectros e à aquisição e análise dos espectros de extratos lipídico. O procedimento experimental que envolveu a manipulação dos murganhos cumpriu todas as normas e licenças emitidas nos termos *Animals (Scientific Procedures) Act of 1986*, seguindo protocolos aprovados pelo *Cancer Research UK, Cambridge Institute Animal Welfare* e pelo *Ethical Review Body*.

Estudo de murganhos KRAS

Na primeira parte do estudo, os grupos de animais utilizados dividiram-se em seis grupos: controlo (N), com pancreatite aguda (Pt), com lesões neoplásicas (PanIN) de baixo-grau (*low-grade*, LG), com lesões neoplásicas (PanIN) de elevado-grau (*high-grade*, HG), com adenocarcinoma ductal pancreático (PDA) e com carcinoma sarcomatóide pancreático (Sarc). Na Tabela 2.1 encontram-se discriminadas as linhagens e as idades dos grupos de murganhos usados. A pancreatite induziu-se nos murganhos WT através de seis injeções intraperitoneais de 50 $\mu\text{g/kg}$ de caerulina, administradas por hora, durante 6 horas. Os murganhos sacrificaram-se através da deslocação da cervical, os seus pâncreas

excisaram-se rapidamente, congelaram-se de imediato em nitrogénio líquido (*freeze-clamp*) e armazenaram-se a -80°C (4). O número médio de células contabilizou-se em amostras representativas de cada grupo, conservadas em parafina, através de análise microscópica (Tabel 2.1).

Tabela 2.1 – Características dos diversos grupos de murganhos utilizados no estudo do modelo de murganhos KRAS.

Condição em estudo/Designação		Nº de animais		Linhagem dos GEMMs (4)	Idade dos murganhos	Nº médio de células do tecido pancreático
Controlo	N	7	(F)	C57BL/6 (WT)	6 a 8 semanas	1761
Pancreatite	Pt	6	(F)	C57BL/6 (WT)	6 a 8 semanas	4454
Lesões de baixo-grau	LG	5	(F)	LSL-Kras ^{G12D/+} - p48 ^{Cre/+}	2, 4 e 9 meses	2794
Lesões de elevado-grau	HG	7	(F)			2422
Adenocarcinoma ductal pancreático	PDA	6	(F)	LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Tpr53 ^{R172H/+} ;Pdx-1-Cre	3 a 6 meses	2318
Carcinoma sarcomatóide pancreático	Sarc	9	(F)			2958

Estudo de murganhos MYC e MYCRAS

Na segunda parte do trabalho, usaram-se os murganhos WT C57BL/6 para o grupo controlo e consideraram-se dois grupos de murganhos distintos: o grupo designado por “MYC” (murganhos R26LSLMycER^{T2}), onde se testou a ativação do oncogene MYC, e o grupo designado por “MYCRAS” (murganhos LSL-KRas^{G12D/+};R26LSLMycER^{T2}), onde se testou a ativação do oncogene MYC na presença de mutações no oncogene KRAS. A ativação do oncogene MYC fez-se com a administração de uma solução do fármaco tamoxifen (TAM) dissolvido em óleo de girassol (10 mg/mL) (Figura 2.1). Escolheu-se o óleo de girassol por ser um constituinte da dieta normal dos animais e ser considerado inócuo, consequentemente. A administração das soluções realizou-se através de duas injeções intraperitoneais de 0.1 mL de solução, espaçadas por 12h. Passadas 12h da última injeção, os murganhos foram sacrificados por deslocamento da cervical.

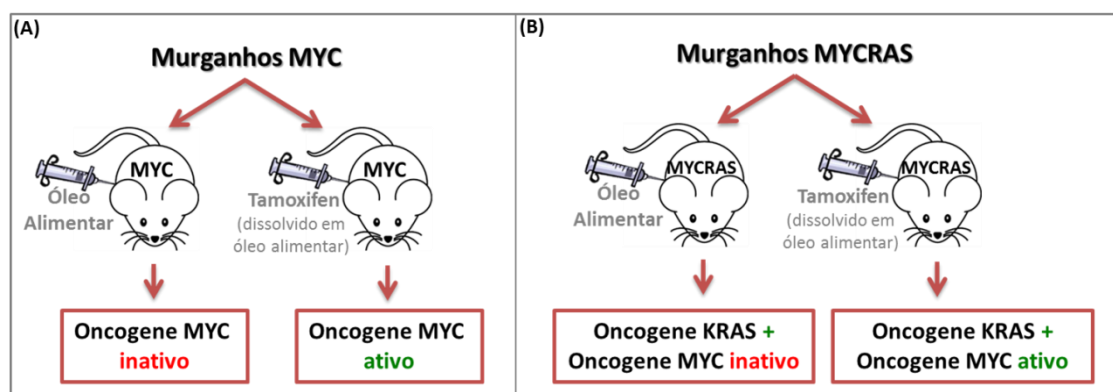


Figura 2.1 – Grupos de murganhos utilizados para o estudo do (A) efeito do oncogene MYC e (B) efeito conjunto dos oncogenes MYC e KRAS no metabolismo de murganhos.

Os grupos usados incluíram machos e fêmeas dentro da mesma condição em estudo (Tabela 2.2), com as fêmeas (n=10) caracterizadas por um peso médio de 20.7 ± 1.4 g e os machos (n=10) por 25.7 ± 1.7 g. A Tabela 2.2 resume as características dos grupos de murganhos utilizados nesta parte do trabalho.

Tabela 2.2 – Grupos de murganhos utilizados no estudo dos efeitos metabólicos do oncogene MYC e dos oncogenes MYC e KRAS.

Designação dos murganhos	Nº de amostras			Idade dos murganhos	Massa média de tecido pancreático (g)
	Total	Fêmeas	Machos		
WT control	10	10	0	12 semanas	0.0969
WT oil	19	12	7		0.134
WT tam	17	7	10		0.140
MYCoil	9	5	4		0.128
MYCtam	11	7	4		0.149
MYCRASoil	8	3	5		0.155
MYCRASam	8	3	5		0.170
82 murganhos					

Depois de sacrificados os murganhos, os seus pâncreas excisaram-se rapidamente, congelaram-se de imediato em nitrogénio líquido (*freeze-clamp*) e armazenam-se a -80°C (Figura 2.2). As amostras pesaram-se congeladas, imediatamente antes da preparação dos extratos. Na Tabela 2.2 encontram-se expressas as massas médias de tecido pancreático para cada grupo.



Figura 2.2 – Procedimento de excisão e congelação a -80°C dos pâncreas de murganhos.

2.2. Preparação de extratos de pâncreas de murganhos

O método de extração por solventes utilizado em ambas as partes deste trabalho, baseou-se no método bifásico metanol/ clorofórmio/ água (2.0:2.0:1.8), descrito na literatura (115) e representado na Figura 2.3. Este protocolo é apropriado para amostras com massas de tecido de 0.05-0.15g, sendo que para valores diferentes devem ser feitos ajustes no volume dos solventes utilizados (115). Colocou-se o tecido pancreático congelado num tubo de homogeneização, com esferas de cerâmica e arrefecido em gelo seco, e adicionaram-se 4.0 mL/g de metanol e 0.85 mL/g de água. Depois de homogeneizado, a uma temperatura inferior a 10°C , o tecido transferiu-se para um tubo de vidro de 1.8 mL e adicionaram-se 4.0 mL/g de clorofórmio e 4.4 mL/g de água. Este mesmo tubo levou-se ao vortéx durante 60 segundos e deixou-se em gelo durante 10 minutos. Passado este período de tempo, centrifugou-se a amostra a 4°C durante 5 minutos, com uma rotação de 2000 g, obtiveram-se as fases apolar (zona inferior) e polar (zona superior) e transferiu-se cada fase para novos tubos de vidro. Secaram-se os extratos, num SpeedVac durante 3-4h, à temperatura ambiente, e armazenaram-se a -80°C até ao momento da análise por RMN.

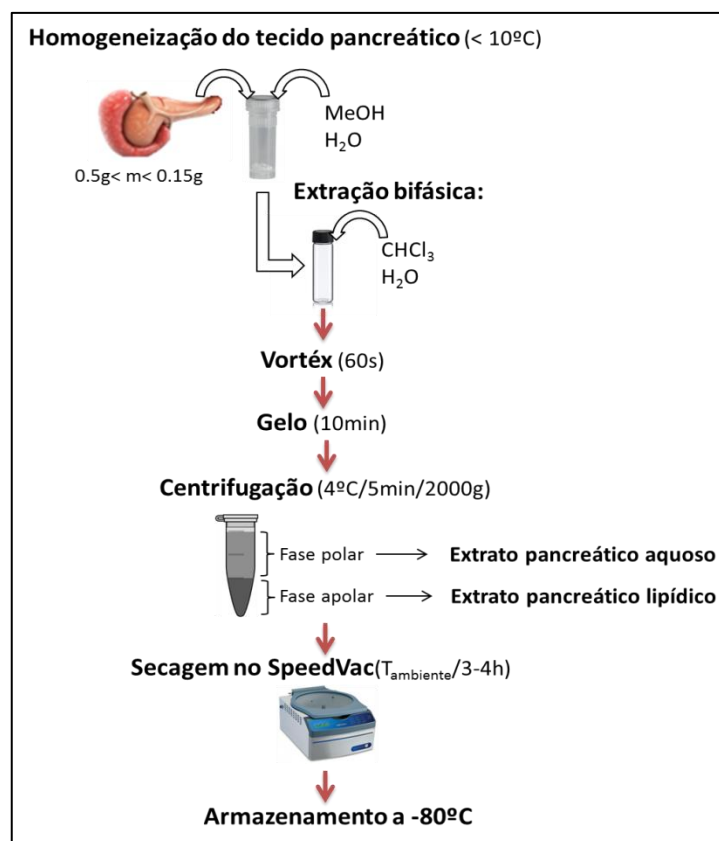


Figura 2.3 – Esquema do procedimento de extração com o método bifásico metanol/ clorofórmio/ água (2.0:2.0:1.8) utilizado na preparação dos extratos aquosos e lipídicos do tecido pancreático de murgancho (115).

2.3. Aquisição e análise dos espectros de RMN

Os extratos aquosos foram ressuspensos em 600 µL de solução tampão fosfato (100 mM, pH 7.4) com 0.05% de ácido 3-trimetilsilil propiônico (*3-(trimethylsilyl)-propionic acid*, TSP) e os extratos lipídicos ressuspenderam-se em 650µL de clorofórmio deuterado com 0.03% de tetrametilsilano (*tetramethylsilane*, TMS). De seguida, pipetaram-se 600µL da amostra para um tubo de RMN de 5mm e, depois de tapado, o tubo selou-se com parafilm. Os tubos mantiveram-se em gelo até 10 minutos antes da aquisição, período em ficavam a equilibrar com a temperatura ambiente. Os espectros de RMN adquiriram-se após 10 minutos adicionais, necessários para estabilização da temperatura (25°C) da sonda do espectrómetro de RMN. A Figura 2.4 ilustra o procedimento acima descrito.

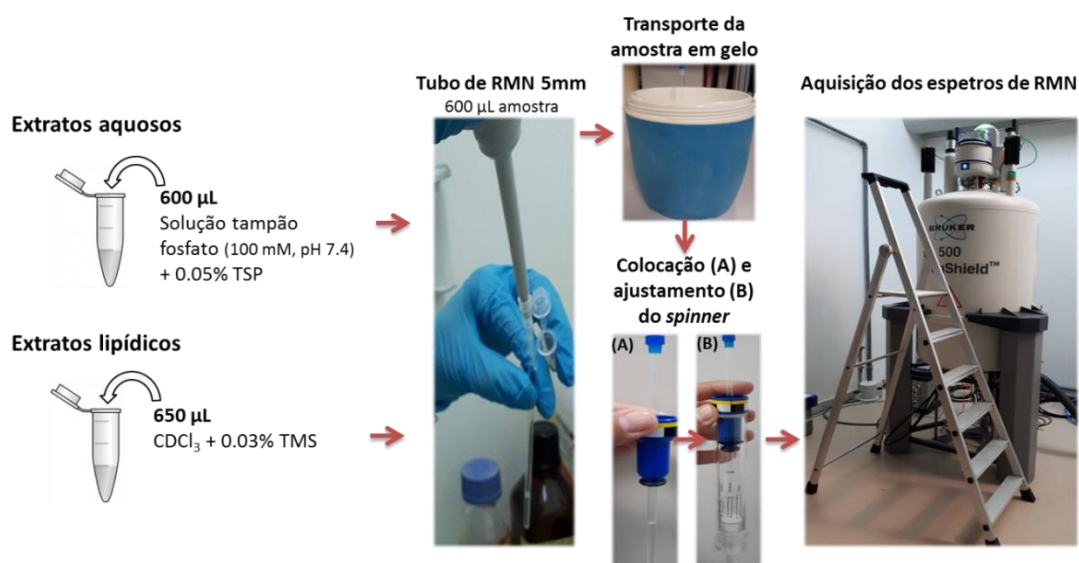


Figura 2.4 – Esquema da preparação dos extratos de pâncreas para a aquisição dos espectros de RMN.

A Tabela 2.3 lista os parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ¹H dos extratos de ambas as partes do trabalho.

Tabela 2.3 – Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ¹H de extratos de pâncreas de murganços; * perda de 11 amostras de extratos lipídicos, devido a problemas ocorridos no transporte entre a Universidade de Cambridge e a Universidade de Aveiro: 4 amostras WToil (F5, F6, M1 e M2), 1 WTtam (F4), 1 MYCoil (M2), 4 MYCtam (F1, F2, F5, M2) e 1 MYCRASoil (M2).

	Murganços KRAS	Murganços MYC e MYCRAS	
	Extratos aquosos	Extratos aquosos	Extratos lipídicos
Espetrômetro	Bruker 600MHz	Bruker 600MHz	Bruker Avance DRX 500
Frequência de ¹ H (MHz)	600.13	600.13	500.13
Programa de pulsos	1D NOESYPR	1D NOESYPR	1D NOESY
Janela espectral	7.3kHz	7.3kHz	8.4kHz
Data points	32 K	32 K	64 K
Tempo de aquisição (s)	4.5	4.5	3.9
Tempo de relaxação (s)	12.5	12.5	14
Nº de espectros adquiridos	40	82	71*

Depois de adquiridos, os espectros foram processados, usando o *software* TopSpin (versão 3.2, Bruker), através da correção manual da fase e linha de base e, ainda, calibração de desvio-químico relativamente às referências internas (TSP no caso dos extratos aquosos e TMS no caso dos extratos lipídicos). De seguida, os espectros alinharam-se usando o algoritmo *recursive segment-wise peak alignment* (RSPA), com o recurso ao *software* Matlab (versão R2012a, MathWorks).

2.4. Análise estatística multivariada e univariada

Cada espectro foi expresso por uma matriz e, no caso dos extratos aquosos, usou-se toda a janela espectral (0.12-10.0 ppm), excluindo-se a região espectral da água (4.73-4.87 ppm). No caso dos extratos lipídicos selecionaram-se diferentes regiões espectrais para construir diferentes matrizes. A Matriz 1 incluiu toda a região espectral (0.50-10.0 ppm), excluindo-se a região do clorofórmio (7.31-7.45 ppm) e respectivos satélites (7.07-7.22 ppm e 7.45-7.49 ppm). A Matriz 2 incluiu todas as regiões espectrais que não se sobrepunham com os sinais do espectro do óleo e que se encontram evidenciadas na Figura 2.5. Salienta-se que o grupo WTcontrol escolheu-se para determinar as regiões características das amostras, pois não foi administrado qualquer tipo de injeção neste grupo. A Matriz 3 incluiu a região espectral característica dos compostos com colina (3.00-4.10 ppm).

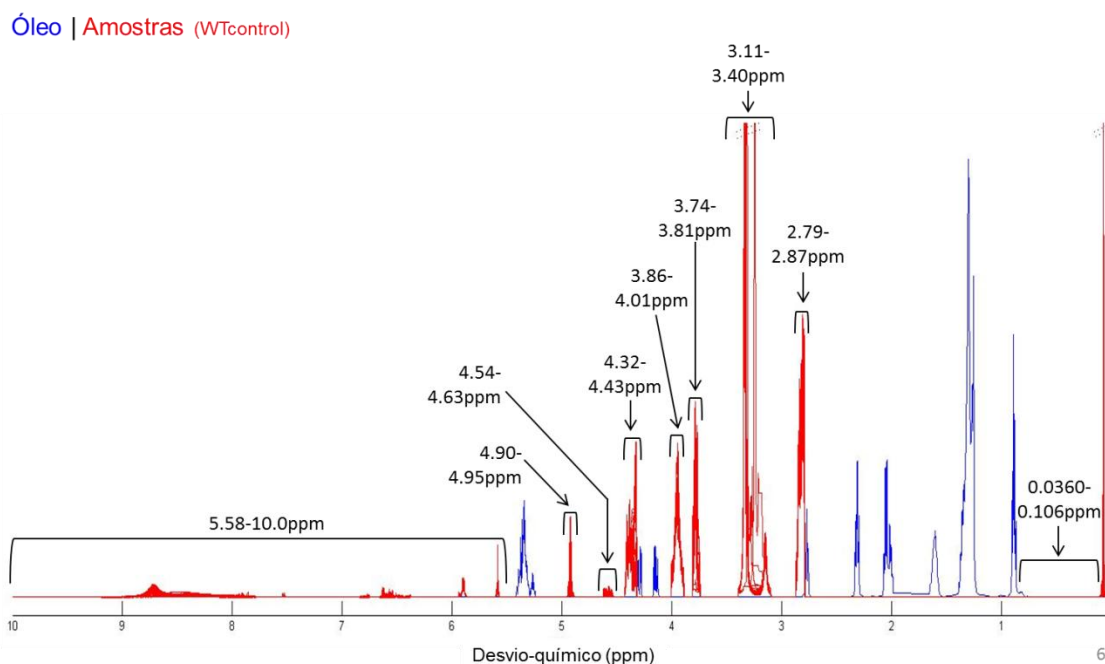


Figura 2.5 – Regiões espectrais utilizadas na construção da Matriz 2 dos extratos lipídicos.

Depois de selecionadas as regiões espectrais, as matrizes importaram-se para o *software* AMIX-Viewer (3.9.14, Bruker) e normalizaram-se pela área total de cada espectro, para diminuir a variabilidade causada por diferentes massas de tecido pancreático. A identificação de sinais fez-se recorrendo ao Amix-Viewer (3.9.14, Bruker), associado à base de dados BBIORFECODE da Bruker, e por comparação com bases de dados como a HMDB (<http://www.hmdb.ca/>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) e com a literatura

(116,117,118). Seguidamente, importou-se cada matriz para o *software* SIMCA (versão 11.5.0.0, Umetrics) e aplicou-se o *scaling* aos dados. Testaram-se diversos tipos de *scaling*, *unit variance* (UV), pareto e centrado, de forma a verificar qual originava um modelo estatístico com o melhor poder preditivo (Q^2) e explicativo (R^2). No caso deste trabalho, escolheu-se o *scaling* UV para ser aplicado a todos os dados.

Em termo da MVA procedeu-se à análise não-supervisionada por PCA e supervisionada por PLS-DA. Os resultados representaram-se em gráficos de *scores*, os quais ilustraram a distribuição das amostras no modelo em estudo. A validade do modelo avaliava-se através dos parâmetros de R^2X , R^2Y e Q^2 . Nos dois tipos de análise supervisionada, o valor de R^2X/R^2Y representa a variância explicada pelo modelo, ao longo do eixo do OX e OY, respetivamente. Com o valor de Q^2 verifica-se a validade do modelo, sendo que valores mais elevados de associam-se a uma melhor discriminação entre as classes.

De seguida, para compreender quais eram os metabolitos que mais contribuíam para a separação observada nos gráficos de *scores*, procedeu-se à projeção dos *loadings*, utilizando o *software* Matlab (versão R2012a, MathWorks). Após identificados, estes metabolitos foram integrados e normalizados pela área total ou relativa ao número médio de células por condição, para a primeira parte deste trabalho.

Os metabolitos selecionados quantificaram-se através das duas possíveis estratégias de quantificação, a absoluta, pois os espectros de RMN adquiriram-se em condições experimentais quantitativas de aquisição, e a relativa. Para a quantificação absoluta usou-se a seguinte equação:

$$cx = \frac{Ax}{Aref} * \frac{Mx}{n^{\circ} \text{ núcleos de } x} * \frac{cref * n^{\circ} \text{ núcleos } ref}{Mref} * 1000 \text{ (mg/L)} \quad (\text{Eq. 1}),$$

onde *x* e *ref* representam o metabolito identificado e a referência interna utilizada, neste caso TSP, respetivamente, e c, A, M representam a concentração mássica, a área do sinal a integrar e a massa molar, respetivamente. A quantificação relativa mediu as variações da área dos sinais, sendo que a aplicação do ES discriminou, ainda, as tendências de variação entre grupos, conforme explicado na introdução (88). O ES e o respetivo erro calcularam-se a partir das seguintes equações:

$$ES = \frac{m_2 - m_1}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1) * s_1^2 + (n_2 - 1) * s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}}} \quad (\text{Eq. 2}),$$

$$ES \text{ erro} = 1.96 * \left(\sqrt{\frac{n_2 + n_1}{n_2 * n_1}} + \frac{ES^2}{2 * (n_2 + n_1)} \right) \quad (\text{Eq. 3}),$$

onde m , n e s representam a média, a dimensão e o desvio-padrão para cada grupo em análise (1 e 2).

A relevância estatística das variações de metabolitos fez-se através do teste de Wilcoxon, visto que é um teste não paramétrico e não tem em conta a distribuição da população amostral (119). Assim, as hipóteses consideradas foram as seguintes: nula (H_0), “a diferença entre os pares segue uma distribuição simétrica em torno de zero”; alternativa (H_1) “a diferença entre os pares não segue uma distribuição simétrica em torno de zero”. O intervalo de confiança considerado foi de 95% ($\alpha=0.05$), pelo que para valores de p-value < 0.05 rejeitava-se a hipótese H_0 e para valores de p-value > 0.05 não se rejeitava a mesma hipótese. A Figura 2.6 esquematiza o fluxo de trabalho que se aplica aos dados, após a aquisição dos espectros, num estudo de metabolómica.

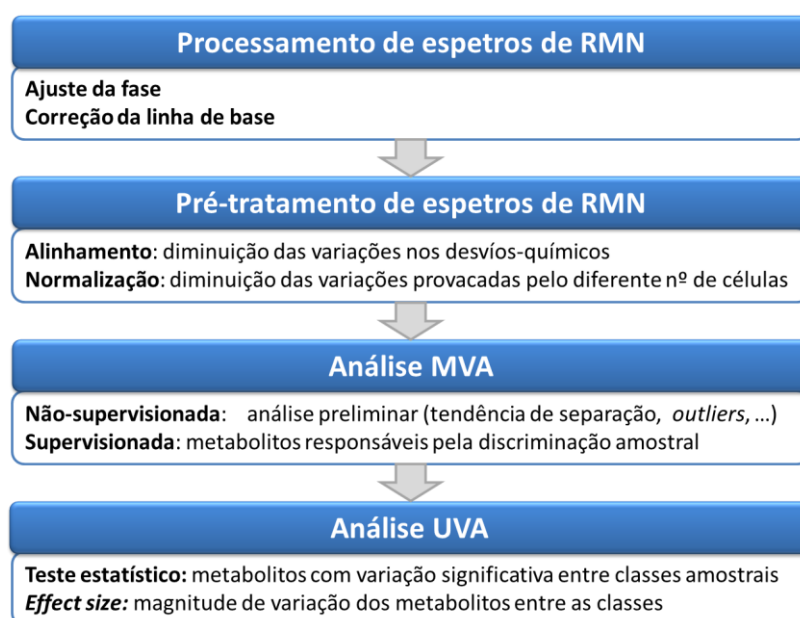


Figura 2.6 – Estratégia aplicada no tratamento e análise dos espectros de RMN de ^1H de extratos de pâncreas.

3. Resultados e discussão

3.1. Interpretação de espectros de RMN de ^1H de extratos aquosos e lipídicos de pâncreas de murganhos

Neste subcapítulo apresentam-se os espectros de RMN de ^1H característicos de extratos aquosos e lipídicos de pâncreas de murganhos. Com este subcapítulo exemplifica-se o tipo de abordagem para a identificação de sinais de espectros de RMN de ^1H .

Extratos aquosos

O espectro médio de RMN de ^1H de extratos aquosos de pâncreas dos murganhos controlo mostrou-se complexo em termos do número de sinais e do grau de sobreposição em várias regiões do espectro (Figura 3.1). As regiões que apresentaram maior sobreposição são 0.05-3.00ppm, 3.00-4.70ppm e 6.00-9.50ppm. Este aspeto reflete a complexidade da composição metabólica pancreática dos murganhos, o que por sua vez reflete a elevada heterogeneidade citológica do pâncreas (120).

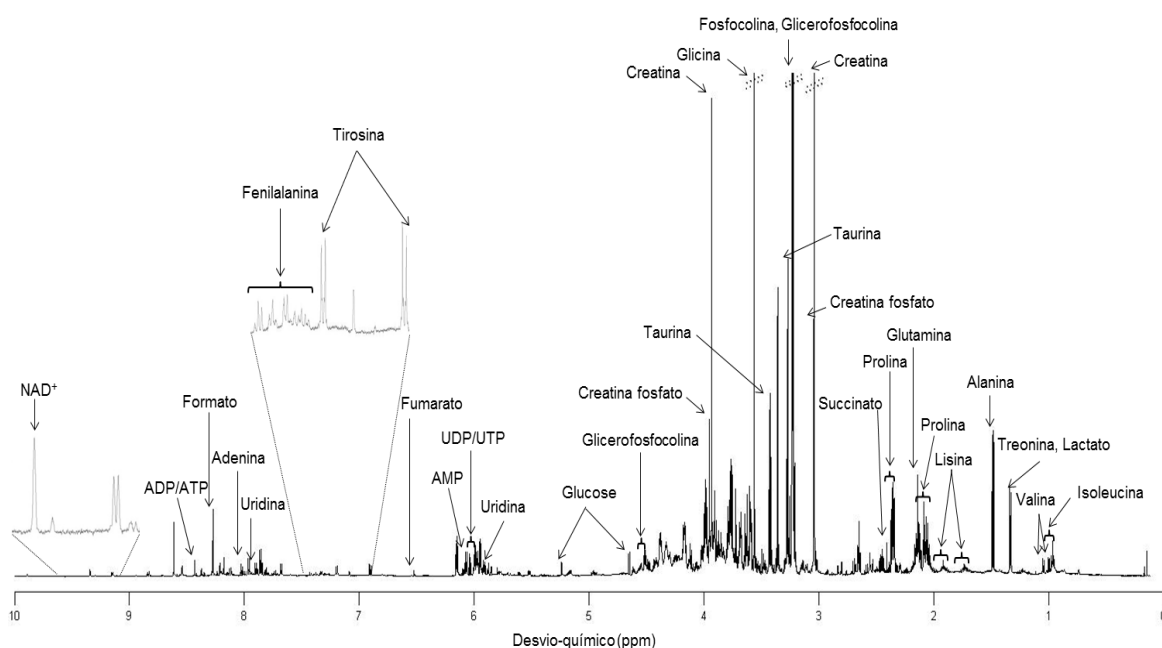


Figura 3.1 – Espectro RMN de ^1H médio de extratos aquosos de pâncreas de murganhos WT C57BL/6 (grupo controlo).

Na região de 0.50-3.00 ppm identificaram-se prótons de vários aminoácidos, nomeadamente a isoleucina, valina, treonina, alanina, lisina, prolina e glutamina (Figura 3.2, A). A fenilalanina e a tirosina identificaram-se entre os 6.90 e os 7.50ppm (Figura

3.1). Na região de 3.00-4.00 ppm identificaram-se a creatina, a creatina fosfato, a colina livre e compostos derivados (fosfocolina e glicerofosfocolina (GPC)), a taurina e a glicina, constituindo os sinais de maior intensidade de todo o espectro (Figura 3.2, B). Nesta mesma região identificaram-se, ainda, os vários sinais pertencentes aos prótons ligados aos carbonos anoméricos da glucose, salientando-se que estes se observaram até os 5.50 ppm (Figura 3.2, B). Entre a região de 6.00-9.00 ppm foi notória a presença dos sinais pertencentes a vários nucleótidos, nomeadamente, AMP, ADP, ATP e UDP, UTP. Entre os 4.00 e os 8.00 ppm, identificaram-se purinas (adenina) e pirimidinas (uracilo). Os ácidos orgânicos observados no espectro, nomeadamente lactato, succinato, fumarato, formato e niacinamida foram também facilmente identificados ao longo de toda a janela espectral (Figura 3.1 e Figura 3.2, A e C).

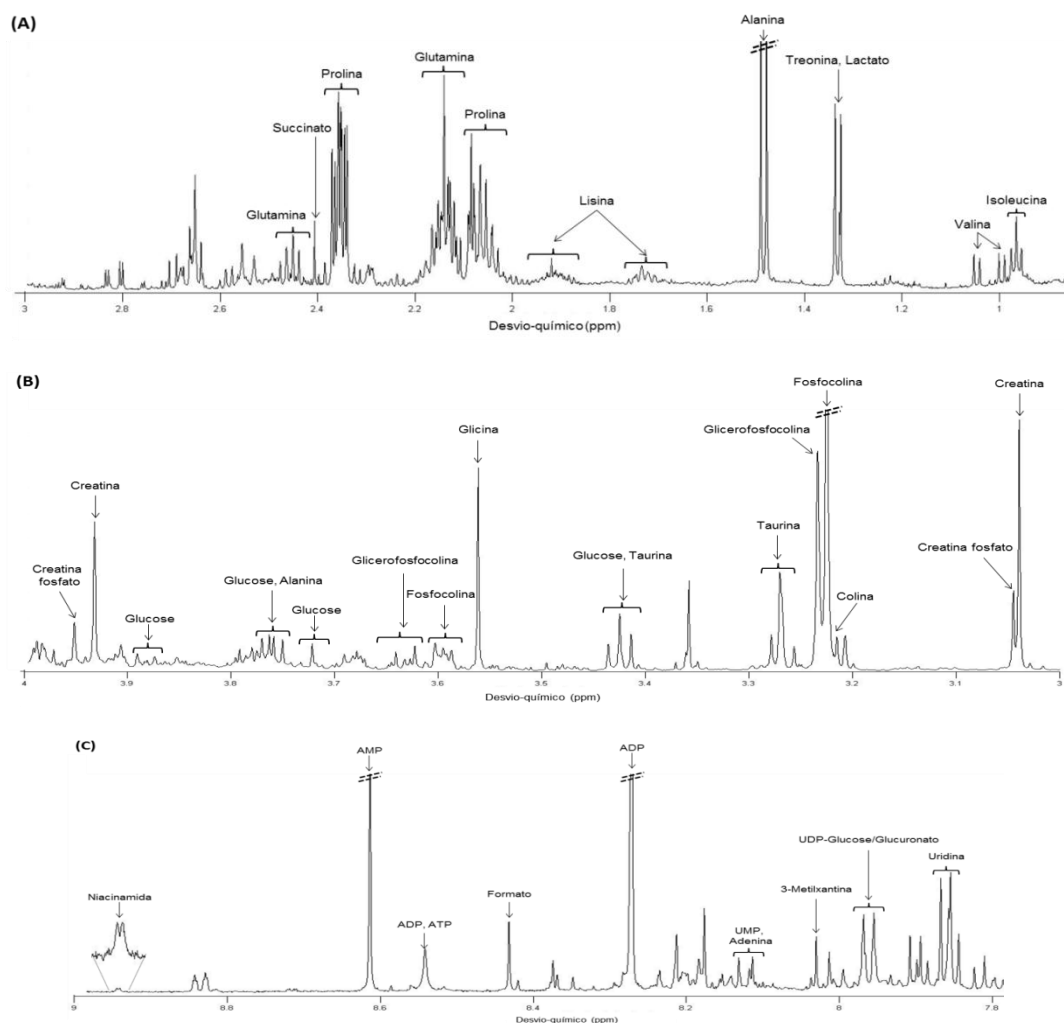


Figura 3.2 – Expansões do espectro RMN de ^1H médio de extratos aquosos de pâncreas de murganhos *wild-type* C57BL/6 (controlo): (A) região 0.05-3.00 ppm; (B) região 3.00-4.00 ppm; (C) região 7.80-9.00 ppm.

A análise de espectros de RMN 2D (*e.g.* TOCSY e HSQC) iria naturalmente auxiliar o processo de identificação, pois a sobreposição de sinais é diminuído. Apesar destes espectros terem sido adquiridos para algumas amostras, os mesmos não foram analisados em detalhe no âmbito desta tese. A identificação aqui apresentada baseou-se essencialmente em espectros 1D disponíveis em bases de dados (BBIREFCODE e HMDB), o que possibilitou o *assignment* do espectro em questão, mostrado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Identificação de metabolitos nos espectros de RMN de ^1H unidimensionais (500MHz) de extratos aquosos de pâncreas de murganhos *wild-type* C57BL/6 (grupo controlo); *s*: singuleto, *d*:duplete, *dd*: duplo-duplete, *t*:triplete, *q*:quarteto, *m*:multiplete

Composto		Desvio-químico, ppm (multiplicidade, identificação)
Bases nitrogenadas	Adenina	8.11 (<i>s</i> , NCHNH), 8.12 (<i>s</i> , NCHN)
	Uracilo	5.78 (<i>d</i> , C5H anél); 7.54 (<i>d</i> , C6H anél)
Aminoácidos e compostos derivados	Alanina	1.48 (<i>d</i> , βCH_3), 3.78 (<i>q</i> , αCH)
	Glutamina	2.13 (<i>m</i> , βCH_2); 2.45 (<i>m</i> , γCH_2)
	Glicina	3.56 (<i>s</i> , αCH)
	Creatina	3.04 (<i>s</i> , NCH ₃); 3.93 (<i>s</i> , NCH ₂)
	Creatina fosfato	3.05 (<i>s</i> , NCH ₃); 3.95 (<i>s</i> , NCH ₂)
	Isoleucina	0.96 (<i>t</i> , γCH_3); 1.01 (<i>d</i> , βCH_3)
	Lisina	1.72 (<i>m</i> , δCH_2); 1.90 (<i>m</i> , βCH_2);
	Fenilalanina	3.97 (<i>dd</i> , αCH); 7.33 (<i>m</i> , C2H/C6H); 7.38 (<i>m</i> , C4H); 7.42 (<i>m</i> , C3H/C5H)
	Prolina	2.07 (<i>m</i> , βCH_2); 2.35 (<i>m</i> , δCH_2)
	Treonina	1.33 (<i>d</i> , CH ₃)
	Tirosina	3.95 (<i>dd</i> , αCH); 6.90 (<i>d</i> , C3H/C5H); 7.19 (<i>d</i> , C2H/C6H)
	Valina	0.99 (<i>d</i> , γCH_3); 1.04 (<i>d</i> , $\gamma'\text{CH}_3$)
Compostos de colina	Colina	3.21 (<i>s</i> , C5H/C6H/C7H anél)
	Fosfocolina	3.22 (<i>s</i> , N(CH ₃) ₃); 3.59 (<i>m</i> , NCH ₂); 4.16 (<i>m</i> , OCH ₂)
	GPC	3.23 (<i>s</i> , N(CH ₃) ₃); 3.62 (<i>m</i> , NCH ₂); 3.90 (<i>m</i> , OCH ₂ , CH); 4.33 (<i>m</i> , OCH ₂)
Hidratos de carbono	α -Glucose	3.41 (<i>t</i> , C5H); 3.53 (<i>dd</i> , C2H); 3.71 (<i>t</i> , C3H); 3.76 (<i>dd</i> , C6H); 3.83 (<i>m</i> , C4H); 3.83 (<i>m</i> , C6H'); 5.23 (<i>d</i> , C1H)
	β -Glucose	3.23 (<i>dd</i> , C2H); 3.40 (<i>t</i> , C5H); 3.47 (<i>dd</i> , C4H); 3.49 (<i>t</i> , C3H); 3.71 (<i>dd</i> , C6H'); 3.89 (<i>m</i> , C6H); 4.64 (<i>d</i> , C1H)
Nucleótidos e compostos derivados	UDP-GalNAc	5.52 (C1H Gal)
	AMP	4.00 (<i>dd</i> , C17H ₂ AMP), 4.36 (<i>dd</i> , C5H AMP), 4.50 (<i>dd</i> , C3H AMP), 6.14 (<i>d</i> , C2H AMP), 8.27 (<i>d</i> , C12H AMP), 8.61 (<i>d</i> , C7H AMP)
	ADP, ATP	8.54 (<i>s</i> , NCHN)
	UDP, UTP	5.98 (<i>m</i> , COCH); 7.97 (<i>m</i> , NCH)
Nucleosídeos e compostos derivados	Uridina	3.88, 4.16 (C5H ribose); 4.23 (C4H ribose); 4.38 (C3H ribose); 5.90 (<i>d</i> , C10H anél); 5.94 (<i>d</i> , C2H anél); 7.86 (<i>d</i> , C11H anél)
	UDP-GlcNAc	5.55 (C1H, Gal)
Ácidos orgânicos	Acetato	1.92 (<i>s</i> , CH ₃)
	Formato	8.43 (<i>s</i> , CH)
	Fumarato	6.52 (<i>s</i> , CH)
	Lactato	1.34 (<i>d</i> , CH ₃); 4.10 (<i>q</i> , CH)
	Niacinamida	7.59 (<i>dd</i> , C5H anél); 8.72 (<i>dd</i> , C6H anél); 8.94 (<i>dd</i> , C2H anél)
	Succinato	2.41 (<i>s</i> , CH ₂)
	Taurina	3.27 (<i>t</i> , SCH ₂); 3.42 (<i>t</i> , NCH ₂)

Na literatura, os estudos sobre o perfil metabólico de murganhos WT através da análise de extratos aquosos, por espectroscopia de RMN de ^1H , são poucos (116,117). Salienta-se que a maior parte dos estudos recorreu ou à análise de biofluidos (urina e plasma) (121-124) ou à análise do tecido pancreático intacto, utilizando a espectroscopia de RMN de ^1H de alta resolução com rotação segundo o ângulo mágico (*high resolution magnetic angle spinning*, HRMAS) (64,125-127). Os espectros dos estudos sobre extratos aquosos revelaram-se semelhantes entre si e caracterizaram-se pela presença de vários metabolitos: aminoácidos, como isoleucina, leucina, valina, alanina, glutamina, na região 0.50-3.00 ppm; colina e compostos derivados de colina, creatina, taurina, betaína, mio-inositol e glicina, na região 3.00-4.00 ppm; glucose, compostos derivados de colina (fosfocolina e GPC), bases nitrogenadas (adenosina e uracilo), purinas (xantina e hipoxantina) e ácidos orgânicos (lactato, hipurato), na região 4.00-8.50 ppm. Deste modo, verifica-se que o espectro de RMN de ^1H , adquirido no âmbito desta tese, revelou-se semelhante aos espectros da literatura, pelo que o perfil metabólico de pâncreas de murganhos WT é idêntico.

Extratos lipídicos

O espectro médio de RMN de ^1H de extratos lipídicos de pâncreas de murganhos controlo caracterizou-se pela presença de sinais largos (Figura 3.3). Esta característica refletiu o alto peso molecular de ácidos gordos e compostos derivados e a sua grande semelhança estrutural.

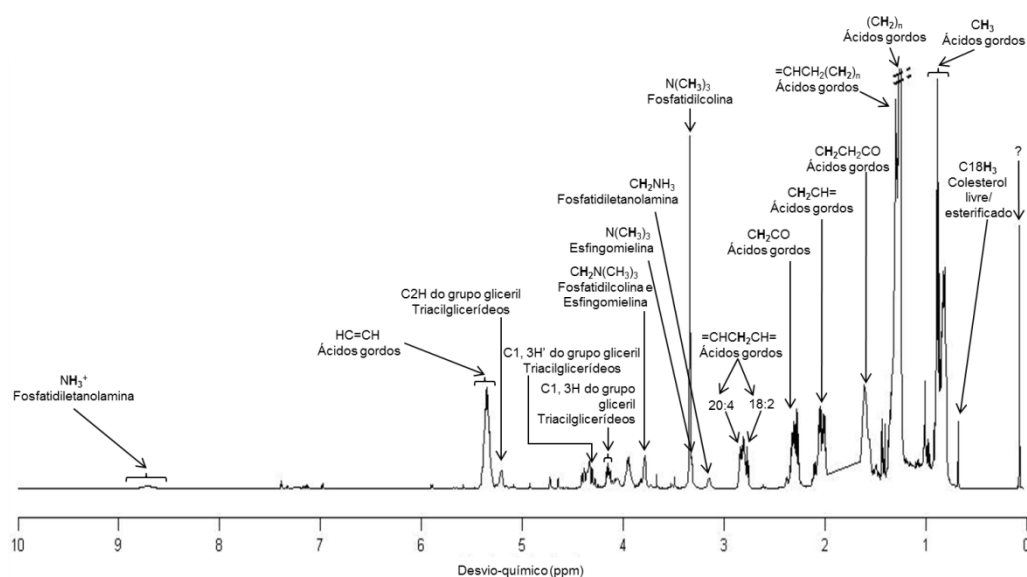


Figura 3.3 - Espectro RMN de ^1H médio de extratos lipídicos de pâncreas de murganhos WT C57BL/6 (controlo).

Os sinais identificados a campo mais alto do espectro (0.05-3.00 ppm) pertenciam, sobretudo a ressonâncias dos prótons do grupo terminal metilo ($-\text{CH}_3$), da cadeia carbonada e vários ambientes de metílico ($-\text{CH}_2\text{CO}$, $=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_n$ e $-(\text{CH}_2)_n$) (Figura 3.4, A). Salienta-se, ainda, um outro sinal, dos ácidos gordos, visível numa região espectral mais próxima dos 5.00 ppm, correspondente aos prótons em ligação dupla ($\text{HC}=\text{CH}$). Segundo a base de dados HMDB, os sinais pertencentes ao colesterol (esterificado ou livre) encontraram-se a campo alto do espectro (0.60-2.00 ppm) (Figura 3.4, A). Contudo, devido à elevada sobreposição com os sinais largos e de elevada intensidade dos ácidos gordos, o único sinal do colesterol (C18H_3) visível foi o singuleto a 0.68 ppm e a região 0.91-1.13 ppm. Os sinais dos compostos de colina, nomeadamente a esfingomiélna, a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina identificaram-se a 3.00-4.00 ppm (Figura 3.4, B). A esfingomiélna e a fosfatidilcolina identificaram-se pela presença de dois sinais distintos, um proveniente dos grupos $-\text{CH}_3$ da trimetilamina (região 3.30 ppm) e outro proveniente do grupo $-\text{CH}_2$ ligado à trimetilamina (região 3.70 ppm). A fosfatidiletanolamina identificou-se pela presença de um singuleto pertencente ao grupo $-\text{CH}_2$ ligado à trimetilamina (região 3.10 ppm). Salienta-se que este fosfolípido identificou-se, ainda, através de um singuleto a baixo campo do espectro (≈ 8.73 ppm), pertencente ao grupo $-\text{NH}_3^+$. A partir dos 4.00 ppm foi possível observar vários sinais pertencentes ao grupo gliceril dos triacilglicerídeos (Figura 3.3).

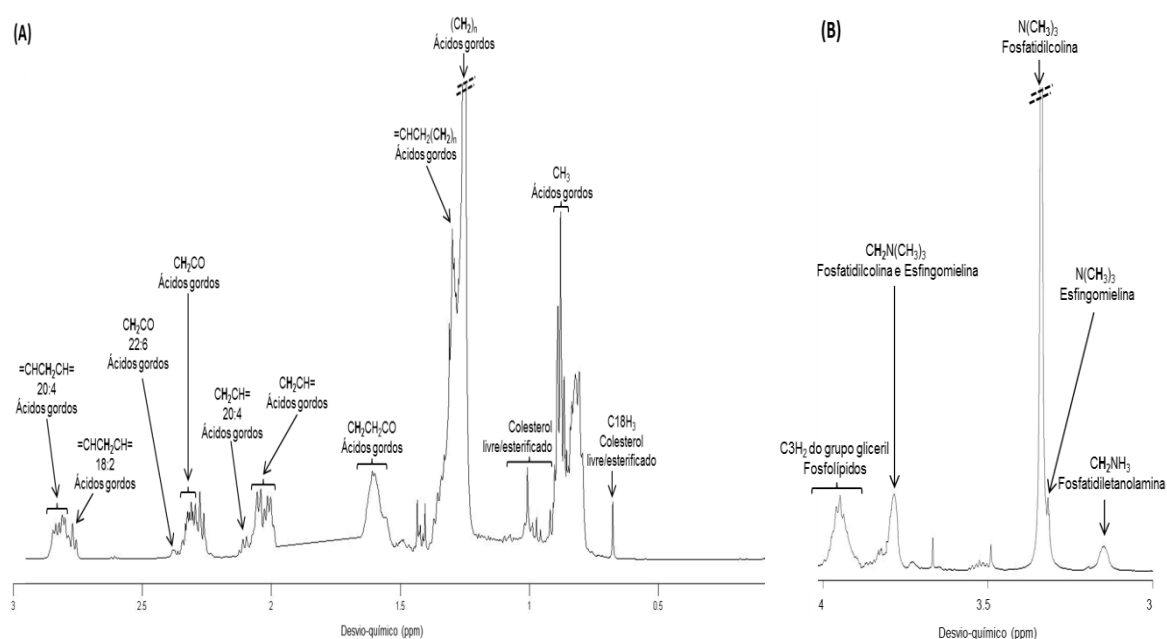


Figura 3.4 – Expansões do espectro RMN de ^1H médio de extratos lipídicos de pâncreas de murganhos *wild-type* C57BL/6 (controlo): (A) região 0.05-3.00 ppm; (B) região 3.00-4.00 ppm.

A lista de sinais identificados por comparação com bases de dados encontra-se apresentada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Identificação dos lípidos visíveis nos espectros de RMN de ^1H unidimensionais (500MHz) de extratos lipídicos de pâncreas de murganhos *wild-type* C57BL/6 (grupo controlo); *s*: singuleto, *d*:duplete, *dd*: duplo-duplete, *t*:triplete, *q*:quarteto, *m*:multiplete, *br*: largo (*broad*, *br*)

Composto	Desvio-químico, ppm (multiplicidade, identificação)
Colesterol Esterificado	0.68 (<i>s</i> , C18H ₃), 0.86 (<i>d</i> , C26H ₃), 0.87 (<i>d</i> , C27H ₃), 0.91 (<i>d</i> , C21H ₃), 0.95 (<i>m</i> , C9H), 0.99 (<i>m</i> , C14H), 1.02 (<i>s</i> , C19H ₃), 1.10 (<i>m</i> , C17H), 1.12 (<i>m</i> , C23H, C24H), 1.13 (<i>m</i> , C22H), 1.15 (<i>m</i> , C1H), 1.35 (<i>m</i> , C20H), 1.58 (<i>m</i> , C2H), 1.60 (<i>m</i> , C15H), 1.84 (<i>t</i> , C4H), 1.87 (<i>t</i> , C15H', C16H), 1.95 (<i>t</i> , C7H), 1.99 (<i>t</i> , C7H'), 2.31 (<i>t</i> , C4H'), 4.61 (<i>m</i> , C3H)
Colesterol Livre	0.68 (<i>s</i> , C18H ₃), 0.86 (<i>d</i> , C26H ₃), 0.87 (<i>d</i> , C27H ₃), 0.91 (<i>d</i> , C21H ₃), 0.95 (<i>m</i> , C9H), 0.99 (<i>m</i> , C14H), 1.01 (<i>s</i> , C19H ₃), 1.07 (<i>m</i> , C17H), 1.10 (<i>m</i> , C17H), 1.12 (<i>m</i> , C23H, C24H), 1.13 (<i>m</i> , C22H), 1.35 (<i>m</i> , C20H), 1.49 (<i>m</i> , C11H), 1.51 (<i>m</i> , C2H), 1.60 (<i>t</i> , C16H), 1.84 (<i>m</i> , C4H), 1.87 (<i>t</i> , C16H), 1.95 (<i>t</i> , C7H), 1.99 (<i>t</i> , C7H'), 2.26 (<i>t</i> , C4H'), 3.53 (<i>m</i> , C3H)
Fosfolípidos	3.15 (<i>s</i> , CH ₂ N(CH ₃) ₃ fosfatidiletanolamina), 3.29 (<i>s</i> , N(CH ₃) ₃ esfingomielina), 3.31 (<i>s</i> , N(CH ₃) ₃ fosfatidilcolina), 3.75 (<i>br</i> , CH ₂ N(CH ₃) ₃ esfingomielina e fosfatidilcolina), 4.32 (<i>br</i> , POCH ₂), 4.38 (<i>br</i> , C1H ₂ gliceril), 5.20 (<i>br</i> , C2H gliceril)
Ácidos gordos	0.89 (<i>br</i> , CH ₃), 1.26 (<i>br</i> , (CH ₂) _n), 1.60 (<i>m</i> , CH ₂ CH ₂ CO), 2.30 (<i>m</i> , CH ₂ CO),
Triacilglicerídeos	4.14 (<i>dd</i> , C1,3H gliceril), 4.29 (<i>dd</i> , C1,3H' gliceril), 5.26 (<i>m</i> , C2H gliceril)

Relativamente à literatura, não foram encontrados estudos que se debruçassem no estudo de espectros de RMN de extratos lipídicos de murganhos. Os estudos, anteriormente referidos, que analisaram o tecido pancreático intacto de murganhos WT, por RMN de HRMAS de ^1H , discriminaram sinais pertencentes a lípidos (sem distinguirem famílias), na região 0.05-0.15 ppm (125,126). Além destes sinais, observaram-se sinais pertencentes a triacilglicerídeo, na região 4.30 ppm e a lípidos, na região 5.40 ppm (126).

3.2. Metabolismo de murganhos com pancreatite (*wild-type*) e em vários estádios de cancro pancreático (modelo KRAS)

A análise metabolómica dos extratos aquosos pancreáticos, por espectroscopia de RMN, concretizada neste trabalho, permitiu identificar o perfil metabólico característico dos diversos grupos de murganhos em estudo, conforme será apresentado ao longo deste capítulo. Recorda-se que todas as análises MVA e UVA tinham sido já realizadas pelo grupo de metabolómica da UA, tendo sido um dos objetivos desta tese confirmar tais resultados e realizar a análise quantitativa dos metabolitos. Esta análise quantitativa inicia este capítulo, seguindo-se o estudo dos perfis metabólicos dos vários grupos de murganhos com o oncogene KRAS ativo.

3.2.1. Escolha de estratégia de quantificação de metabolitos: absoluta ou relativa

A espectroscopia de RMN possui um carácter quantitativo, conforme mencionado na Introdução. No entanto, os estudos metabolómicos utilizam quase sempre a quantificação relativa, devido aos desafios práticos inerentes à quantificação absoluta (128). Um destes desafios, já descrito na literatura, reside no facto de algumas referências internas (*e.g.* TMS) interagirem com macromoléculas ou outros componentes da amostra (129). Como tal, a área do sinal da referência é influenciada e consequentemente a quantificação também (rever Equação 1, página 42). Um outro desafio é o tempo de aquisição dos espectros ser bastante demorado, pois o tempo de espera, entre *scans* consecutivos, tem de ser 5 vezes o tempo de relaxação T_1 , pelo menos (129). Normalmente esta condição leva a um tempo de espera de muitas dezenas de segundos, o que é problemático no caso da análise de grandes números de amostras, pois a aquisição de um espectro de RMN é muito demorada. Dado que os espectros deste trabalho foram adquiridos em condições quantitativas (cerca de 1h40min /amostra, um total de 276 h para todos os 194 espectros adquiridos), resolveu-se investigar a possibilidade de se aplicar a análise quantitativa aos dados. Este cálculo exemplificou-se para o glutamato e ATP, nos seis grupos de murganhos em estudo na primeira parte do trabalho (N, Pt, LG, HG, PDA e Sarc). A Figura 3.5 descreve a concentração média destes dois compostos, em mg por litro de extrato.

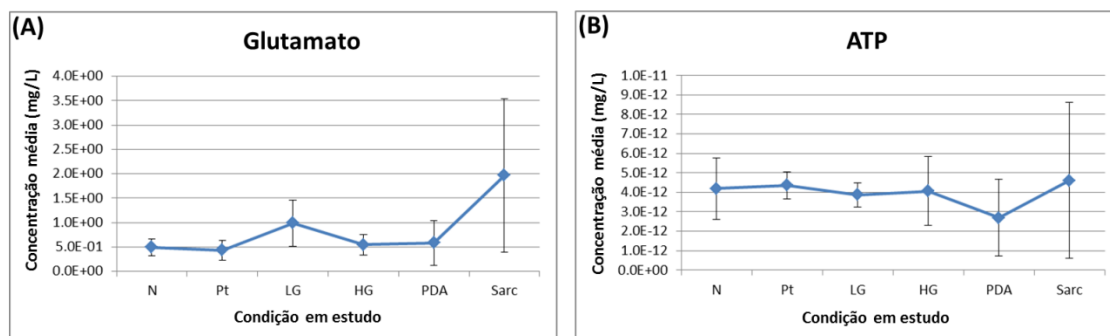


Figura 3.5 – Concentração média de glutamato (A) e ATP (B), mg/L de extrato, para cada condição em estudo, calculada a partir da relação da área do sinal integrado a 2.36 ppm e 6.15 ppm, respetivamente, com a área e a concentração de TSP (Equação 1, página 42).

A concentração final deveria ser expressa em termos de mg de metabolito/100g de tecido, no entanto os valores das massas das amostras não se encontravam disponíveis. Deste modo, os valores de concentração (mg de metabolito/L de extrato) de cada amostra para condição poderão ser comparáveis, apenas, quando se assume que as massas dos pâncreas são semelhantes. No entanto, este facto não é necessariamente verificado, conforme se observou no caso dos murganhos utilizados na segunda parte do trabalho (Tabela 2.2, página 37) e, por isso, estes valores têm um carácter algo subjetivo. Além disso é importante verificar se há interferências com a referência interna. Para tal, verificou-se a área do sinal da referência interna (TSP), adicionado em igual volume (6.50×10^{-6} L) e concentração (5.00×10^{-3} g/L) a todas as amostras. A Figura 3.6 (A) ilustra a elevada variabilidade na área espectral do sinal de TSP entre os vários espetros. Esta variabilidade originou dispersão entre as condições em estudo, sendo esta mais notória entre a N-Pt, Pt-LG e PDA-Sarc (Figura 3.6, B).

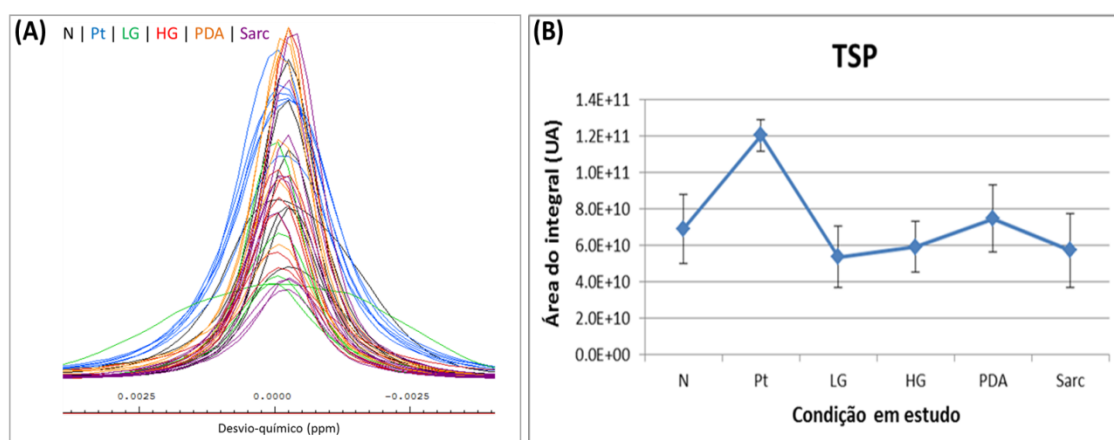


Figura 3.6 – (A) Variação da área espectral e da (B) área média do sinal de TSP nos espetros de RMN de ^1H dos extratos aquosos.

Estes resultados comprovaram que o TSP interagiu com componentes da amostra, promovendo interações *spin-spin* nuclear, o que se refletiu num tempo de relaxação transversal (T_2) menor. Esta diminuição de T_2 levou a que o sinal fosse mais largo, visto que T_2 é inversamente proporcional à largura do sinal (a meia altura). Assim, a quantificação absoluta dos dados ficou inviabilizada, pelo que se optou pela quantificação relativa dos metabolitos, como é prática comum nos estudos metabolómicos.

A quantificação relativa exemplificou-se também para o glutamato e ATP, tomando como referência a área total do espetro, assumindo que esta é proporcional à quantidade de amostra, quando esta é de composição homogénea. Dado a heterogeneidade do tecido pancreático, explorou-se também a possibilidade de normalizar a área dos sinais pelo número médio de células em cada tipo de amostra. Para tal, usaram-se amostras representativas de cada condição, não tendo sido possível caracterizar histologicamente todas as amostras analisadas por espectroscopia de RMN. No caso de ambos os metabolitos, as trajetórias obtidas pelos dois tipos de normalização foram concordantes para todas as condições, com exceção das condição N e Pt, (Figura 3.7). Estas variações sugerem que a área total do espetro nem sempre reflete fielmente o número de células, comprovando-se que depende também do(s) seu(s) tipo(s).

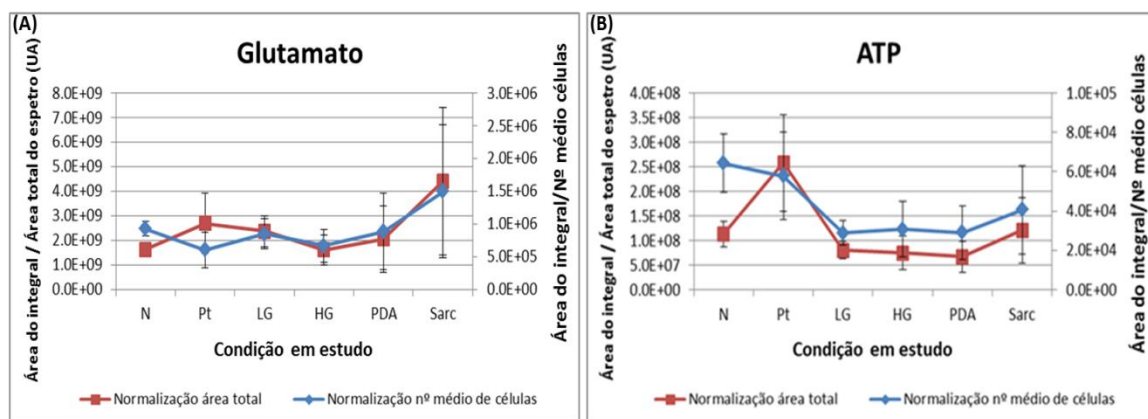


Figura 3.7 - Comparação do efeito entre a normalização pela área total (linha vermelha) e normalização pelo número médio de células (linha azul) na área média do (A) sinal de glutamato integrado a 2.36 ppm e do (B) sinal de ATP integrado a 6.15 ppm.

Seria muito interessante conhecer o perfil citológico de cada amostra e relacioná-lo com o perfil metabólico, permitindo a quantificação absoluta dos metabolitos por cada tipo de célula. Na falta desta informação, teve necessariamente que se optar pela quantificação relativa à área total, assumindo que a área média por célula é constante.

3.2.2. Perfil metabólico de murganhos com pancreatite

De modo a compreender o metabolismo característico do pâncreas de murganhos com pancreatite aguda (Pt) comparou-se o seu perfil metabólico com o de murganhos selvagens/saudáveis (controlo, N), através da análise dos espectros de extratos aquosos de pâncreas. A análise de PCA (Figura 3.8, A) revelou um agrupamento entre as diferentes classes de murganhos, principalmente ao longo de primeiro componente principal PC1. A dispersão no grupo de murganhos controlo pareceu ser maior do que no grupo com pancreatite, o que indica que esta condição alterou o perfil metabólico de forma muito consistente. A análise por PLS-DA melhorou o agrupamento entre cada classe de murganhos e tornou clara a separação ao longo do componente LV1 ($Q^2=0.970$) (Figura 3.8, B).

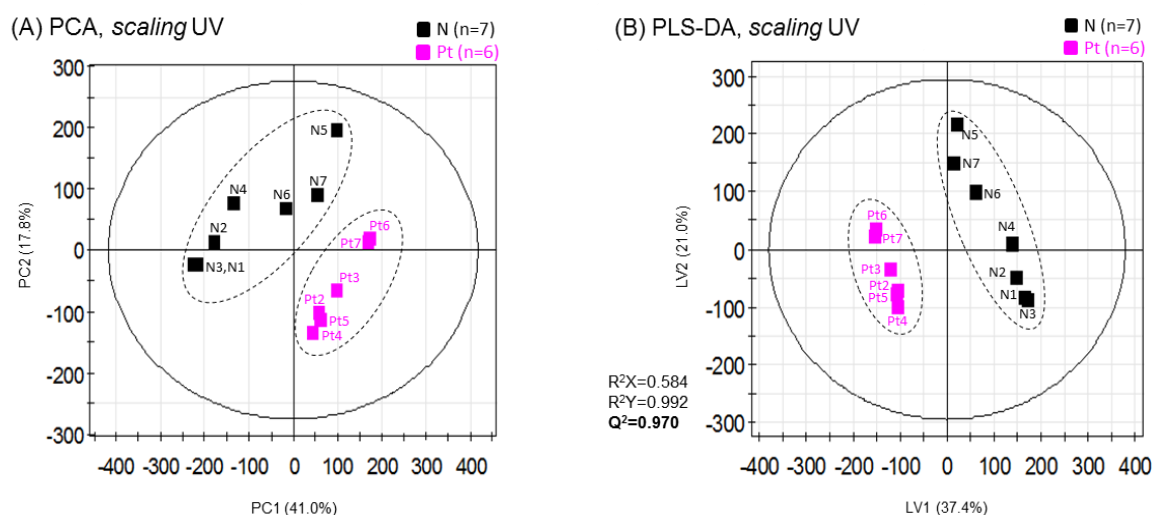


Figura 3.8 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA de espectros de murganhos N e murganhos Pt.

Para identificar quais as variações de metabolitos que explicavam esta separação de grupos, procedeu-se à análise do gráfico de *loadings* de LV1, correspondente ao modelo PLS-DA (Figura 3.9). Neste gráfico, em primeiro, o peso da contribuição dos metabolitos para a separação das classes, denominado de VIP (*variable importance to the projection*), é representado pela escala da barra de cores, sendo que os picos de cor amarela/vermelha correspondem a metabolitos com contribuição elevada para a separação entre grupos. Picos positivos representam metabolitos aumentados nos murganhos agrupados em valores de LV1 positivos (controlo) e picos negativos representam metabolitos aumentados nos murganhos agrupados em valores de LV1 negativos (pancreatite). Alguns dos metabolitos

aumentados nos murganhos controlo com maior contribuição foram a valina, a alanina, a creatina, a AMP e a tirosina e nos murganhos com pancreatite foram o glutamato, a GSH e a taurina. No entanto, estas variações (e outras) foram de seguida confirmadas por integração e UVA.

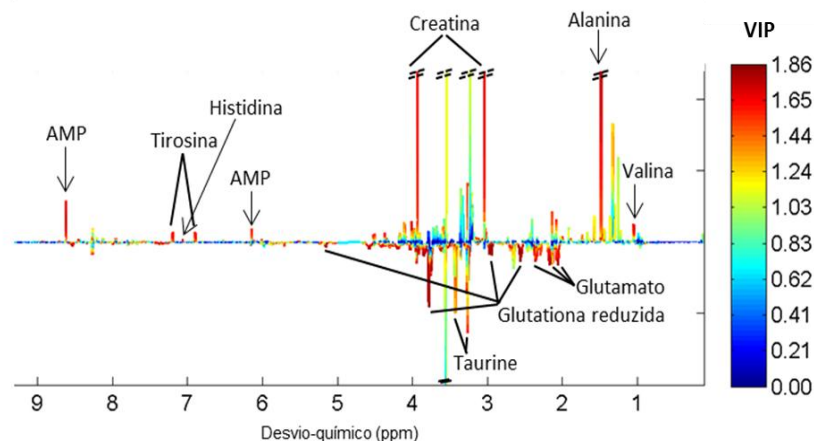


Figura 3.9 - Representação dos *loadings* de LV1 resultante da análise PLS-DA da comparação do perfil metabólico dos murganhos N com o dos murganhos Pt.

A UVA aplicou-se aos metabolitos que apresentavam sinais com $VIP > 1$. Conforme é possível verificar na Tabela 3.3, o perfil metabólico da pancreatite caracterizou-se por: a) aumento de ADP, ATP, fenilacetato, fenilalanina, glucose, glutamato, GSH e taurina; b) diminuição de alanina, adenosina monofosfato (AMP), creatina, formato, fumarato, fosfocolina, GPC, histidina, niacinamida, *N*-óxido de trimetilamina (TMAO), tirosina, uridina difosfato-*N*-acetil glucosamina (UDP-GlcNAc), uridina monofosfato (UMP) e valina.

O tecido com pancreatite apresentou um grande número de alterações no metabolismo de nucleótidos, ácidos orgânicos e, ainda, de alguns aminoácidos. No final deste capítulo será discutida o impacto metabólico das variações mais relevantes para a discriminação entre o tecido pancreático saudável e com pancreatite.

3.2.3. Perfil metabólico de murganhos com diferentes estadios de cancro pancreático

A comparação entre os perfis metabólicos dos diferentes estadios de cancro é relevante para a descoberta de biomarcadores, os quais podem possibilitar um diagnóstico precoce e diferencial. A caracterização metabólica das lesões neoplásicas de baixo-grau

poderá permitir prever a sua deteção (LG vs. N) ou distinção de pancreatite (Pt vs. LG) ou evolução para lesões neoplásicas de elevado-grau (HG vs. LG). Por outro lado, a possibilidade de distinguir metabolicamente os dois tipos de cancros pancreáticos em questão (PDA vs. Sarc) pode ajudar a um diagnóstico diferencial, sem o recurso métodos invasivos (*e.g.* biópsias) e, ainda, uma terapêutica direcionada.

Tabela 3.3 – Metabolitos significativamente alterados ($p\text{-value} < 0.05$, $ES > ES\text{ erro}$) no perfil metabólico dos murganhos com pancreatite (**Pt**) relativamente aos controlos (**N**); *s*: singuleto, *d*:duplete, *dd*: duplo-duplete, *t*:tripleto, *m*:multiplete.

Identificação do metabolito		Pt (n=6) vs. N (n=7)				<i>p-value</i>
Nome	δ/ppm (multiplicidade)		ES	±	ES erro	
ADP	8.28 (<i>s</i>)	↑	3.31	±	1.63	1.22E-06
Alanina	1.48 (<i>d</i>)	↓	-4.92	±	2.15	4.40E-05
AMP	8.60 (<i>s</i>)	↓	-3.79	±	1.77	2.64E-02
ATP	6.15 (<i>d</i>)	↑	4.67	±	2.06	1.19E-04
Creatina	3.04 (<i>s</i>)	↓	-3.81	±	1.78	1.60E-04
Fenilacetato	7.28 (<i>t</i>)	↑	3.02	±	1.54	2.60E-03
Fenilalanina	7.42 (<i>t</i>)	↑	3.24	±	1.61	5.60E-05
Formato	8.46 (<i>s</i>)	↓	-3.22	±	1.60	1.20E-03
Fumarato	6.52 (<i>s</i>)	↓	-1.46	±	1.16	1.50E-02
Fosfocolina	3.22 (<i>s</i>)	↓	-2.08	±	1.29	1.90E-03
Glucose	5.23 (<i>d</i>)	↑	2.23	±	1.33	2.20E-03
Glutamato	2.35 (<i>m</i>)	↑	4.38	±	1.97	7.90E-06
GPC	3.23 (<i>s</i>)	↓	-1.19	±	1.11	4.30E-02
GSH	4.57 (<i>m</i>)	↑	7.70	±	3.13	1.20E-03
Histidina	7.08 (<i>s</i>)	↓	-2.28	±	1.34	9.30E-04
Niacinamida	8.94 (<i>s</i>)	↓	-2.52	±	1.40	8.40E-04
Taurina	3.26 (<i>t</i>)	↑	2.36	±	1.36	1.20E-03
TMAO	3.27 (<i>s</i>)	↓	-1.85	±	1.24	6.20E-03
Tirosina	7.20 (<i>d</i>)	↓	-2.91	±	1.51	3.70E-04
UDP- <i>N</i> -acetil glucosamina	5.52 (<i>dd</i>)	↓	-3.55	±	1.70	1.30E-04
UMP	8.11 (<i>d</i>)	↓	-2.39	±	1.37	7.30E-04
Valina	1.05 (<i>d</i>)	↓	-1.76	±	1.22	5.70E-03

Perfil metabólico de murganhos com lesões neoplásicas pancreáticas de baixo-grau comparativamente a murganhos controlo

A análise de PCA dos espetros de extratos aquosos de pâncreas, não revelou nenhuma separação notória entre a classe dos murganhos controlo (N) e a dos murganhos com lesões neoplásicas de baixo-grau (LG) (Figura 3.10, A). Contudo pareceu existir uma subtil separação ao longo de PC2, salientando-se duas amostras LG como possíveis *outliers*, LG14 e LG15. Contudo, na análise de PLS-DA (Figura 3.10, B), estas amostras

enquadraram-se dentro do padrão de distribuição da classe de murganços a que pertenciam, pelo que não foram excluídas de análises posteriores. Em PLS-DA foi claramente visível uma separação robusta ($Q^2=0.744$) entre as duas classes de murganços ao longo do componente LV1 (Figura 3.10, B), pelo que os murganços controlo agruparam-se em valores positivos de LV1 e os murganços LG agruparam-se em valores negativos de LV1. Note-se que pareceu existir uma maior dispersão na classe LG comparativamente à classe dos controlos.

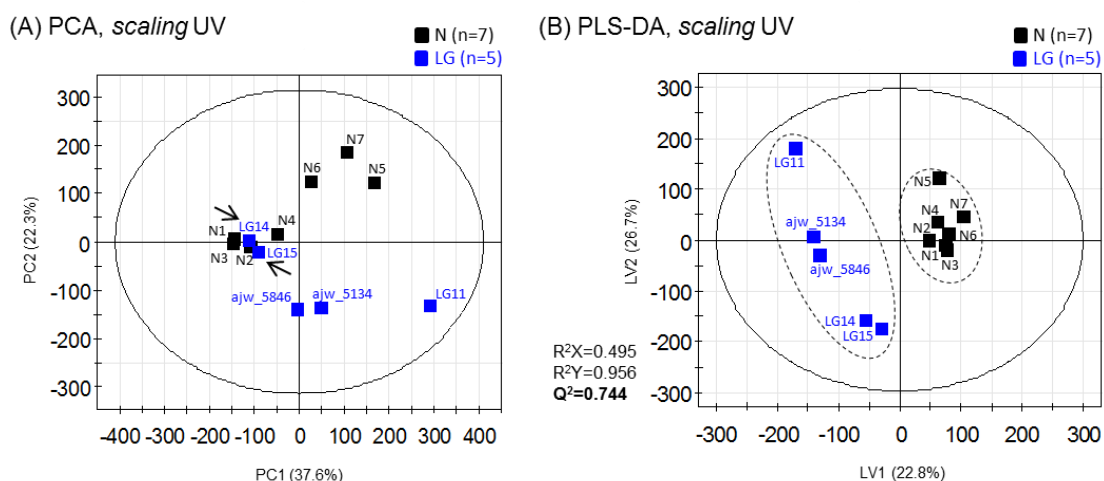


Figura 3.10 – Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA de espectros de murganços N e murganços LG.

Conforme se pode verificar pela análise do gráfico da projeção dos *loadings* de LV1 (Figura 3.11), foram vários os metabolitos que contribuíram com um elevado peso ($VIP>1$) para a separação de grupos. Salientando-se aqueles com maior contribuição, o perfil metabólico dos murganços LG caracterizou-se por: a) aumento de glutamato e glucose e b) diminuição de valina, alanina, creatina, fosfocolina, tirosina e histidina relativamente aos murganços controlo.

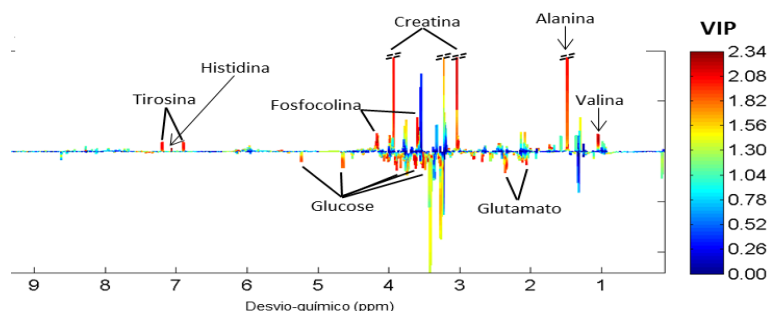


Figura 3.11 – Representação dos *loadings* de LV1 resultante da análise PLS-DA da comparação do perfil metabólico dos murganços N com o dos murganços LG.

Assim, os pâncreas com lesões citológicas LG caracterizaram-se por: a) aumento de aspartato, fenilalanina, fosfocolina, histidina, mio-inositol e sacarose e b) diminuição, estatisticamente significativa, de alanina, creatina, glucose, glutamato, lisina, tirosina, UDP-glucose/glucuronato, UDP-GlcNAc e valina (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Metabolitos significativamente alterados (p -value <0.05, ES > ES erro) no perfil metabólico das lesões neoplásicas pancreáticas LG relativamente aos controlos N; *s*: singuleto, *d*:dupleteo, *dd*: duplo-dupleteo, *t*:tripleto, *m*:multipleteo

Identificação do metabolito		LG (n=5) vs. N (n=7)			<i>p</i> -value
Nome	δ/ppm (multiplicidade)	ES	±	ES erro	
Alanina	1.48 (<i>d</i>)	↓	-3.81	± 1.86	3.80E-05
Aspartato	2.80 (<i>d</i>)	↑	2.96	± 1.59	2.70E-03
Creatina	3.04 (<i>s</i>)	↓	-3.04	± 1.61	1.20E-04
Fenilalanina	7.42 (<i>t</i>)	↑	1.84	± 1.29	4.70E-02
Fosfocolina	4.10 (<i>m</i>)	↑	4.22	± 1.99	7.20E-04
Glucose	5.23 (<i>d</i>)	↓	-1.65	± 1.25	3.90E-02
Glutamato	2.35 (<i>m</i>)	↓	-1.48	± 1.21	2.50E-02
Histidina	7.05 (<i>s</i>)	↑	1.90	± 1.30	2.60E-02
Lisina	1.70 (<i>m</i>)	↓	-3.65	± 1.81	3.70E-04
Mio-inositol	4.06 (<i>t</i>)	↑	1.87	± 1.30	2.40E-02
Sacarose	5.42 (<i>d</i>)	↑	1.69	± 1.26	1.80E-02
Tirosina	7.20 (<i>d</i>)	↓	-2.76	± 1.53	2.60E-04
UDP-glucose/glucuronato	7.95 (<i>d</i>)	↓	-2.41	± 1.43	3.20E-03
UDP- <i>N</i> -acetil glucosamina	5.52 (<i>dd</i>)	↓	-3.04	± 1.61	4.20E-03
Valina	1.05 (<i>d</i>)	↓	-1.72	± 1.26	7.70E-03

De um modo geral, o tecido com lesões neoplásicas LG apresentou uma maior variação no metabolismo de aminoácidos relativamente ao tecido saudável. No final deste capítulo serão discutidas as alterações metabólicas que melhor caracterizam as lesões LG.

Perfil metabólico da pancreatite comparativamente às lesões neoplásicas pancreáticas de baixo-grau

Os dois tipos de análises, PCA e PLS-DA (Figura 3.12), revelaram uma perfeita separação entre os murganhos Pt e os murganhos LG, ao longo do primeiro componente PC1 e LV1, respetivamente. A separação observada na análise de PLS-DA foi coerente com a elevada robustez ($Q^2=0.865$) do modelo estatístico. A maior dispersão no grupo de murganhos LG relativamente ao grupo Pt foi concordante entre ambas as análises, no entanto pareceu verificar-se um aumento da dispersão neste último grupo, na análise de PLS-DA.

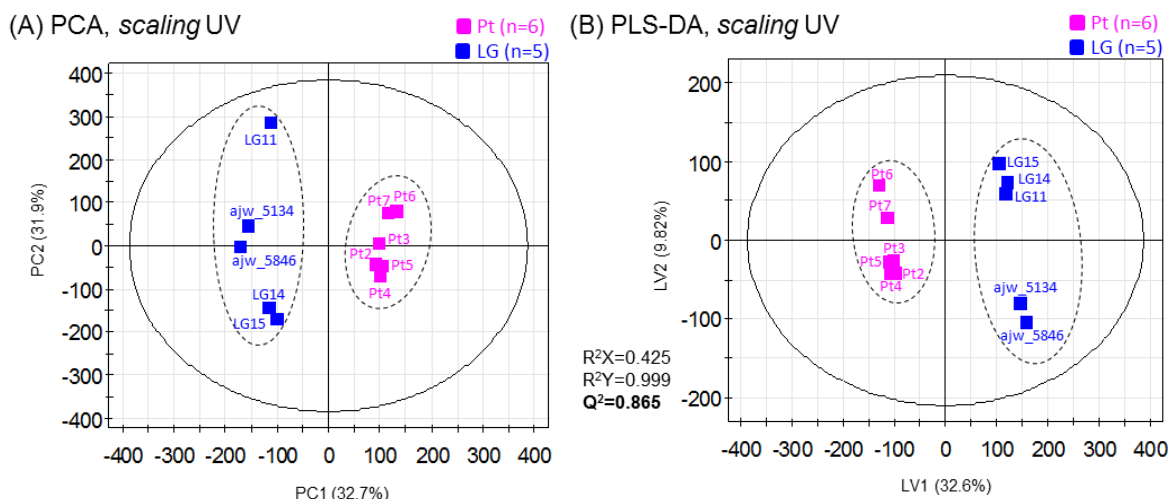


Figura 3.12 – Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA de espectros de murganhos Pt e murganhos LG.

Através da análise do gráfico da projeção dos *loadings* de LV1 verificou-se que foram vários os metabolitos que contribuíram com relevância para a separação das classes de murganhos (Figura 3.13). Em termos gerais, o perfil metabólico da pancreatite comparativamente às lesões neoplásicas LG caracterizou-se por: a) aumento de glutamato, GSH e glicina e b) diminuição de lactato, TMAO, GPC, glucose e AMP.

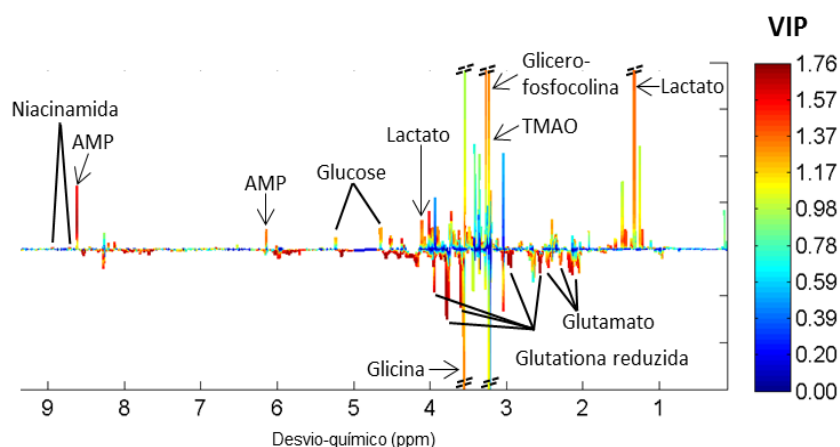


Figura 3.13 – Representação dos *loadings* de LV1 resultante da análise PLS-DA da comparação do perfil metabólico dos murganhos Pt com o dos murganhos LG.

Assim, conforme apresentado na Tabela 3.5, a variação da magnitude do ES caracterizou e distinguiu o perfil metabólico da pancreatite relativamente às lesões neoplásicas LG através das seguintes alterações: um aumento de ADP, ATP, creatinina, glutamina, fenilacetato, fosfocolina, GSH, leucina, dinucleótido de nicotinamida e adenina

oxidado (NAD⁺) e UDP-Glucose/Glucuronato no grupo de murganhos Pt; uma diminuição de 3- hidroxi-isovalerato (3-HIVA), alanina, AMP, GPC, lactato, niacinamida, succinato, TMAO e UMP.

Tabela 3.5 - Metabolitos significativamente alterados (p -value <0.05, ES > ES erro) na distinção da pancreatite (Pt) relativamente às lesões neoplásicas pancreáticas de baixo-grau (LG); *s*: singuleto, *d*:dupleteo, *dd*: duplo-dupleteo, *t*:tripleto, *m*:multipleto

Identificação do metabolito		Pt (n=6) vs. LG (n=5)			p -value
Nome	δ /ppm (multiplicidade)	ES	\pm	ES erro	
3-HIVA	1.25 (<i>d</i>)	↓	-1.37	\pm 1.23	4.30E-03
ADP	8.28 (<i>s</i>)	↑	2.71	\pm 1.57	4.30E-03
Alanina	1.48 (<i>d</i>)	↓	-1.71	\pm 1.30	4.50E-02
AMP	8.60 (<i>dd</i>)	↓	-6.15	\pm 2.79	2.30E-06
ATP	6.16 (<i>d</i>)	↑	2.48	\pm 2.67	4.30E-06
Creatinina	3.04 (<i>s</i>)	↑	2.67	\pm 1.56	8.70E-03
Fenilacetato	4.17 (<i>m</i>)	↑	1.66	\pm 1.29	1.30E-02
Fosfocolina	7.26 (<i>t</i>)	↑	3.10	\pm 1.69	1.70E-03
GPC	3.23 (<i>s</i>)	↓	-1.67	\pm 1.29	4.60E-02
Glutamina	2.45 (<i>m</i>)	↑	2.63	\pm 1.55	1.20E-03
GSH	4.57 (<i>m</i>)	↑	10.87	\pm 4.67	4.30E-03
Lactato	1.33 (<i>d</i>)	↓	-2.25	\pm 1.44	1.80E-02
Leucina	0.96 (<i>t</i>)	↑	1.59	\pm 1.27	1.90E-02
NAD ⁺	9.34 (<i>s</i>)	↑	1.63	\pm 1.28	3.90E-02
Niacinamida	8.94 (<i>d</i>)	↓	-2.86	\pm 1.61	3.60E-03
Succinato	2.41 (<i>s</i>)	↓	-1.82	\pm 1.33	2.90E-02
TMAO	3.27 (<i>s</i>)	↓	-1.21	\pm 1.20	4.30E-03
UDP-Glucose/Glucuronato	7.95 (<i>d</i>)	↑	2.87	\pm 1.62	1.60E-03
UMP	8.10 (<i>d</i>)	↓	-2.74	\pm 1.58	8.70E-04

O tecido com pancreatite apresentou alterações relativamente ao tecido com lesões neoplásicas LG, sobretudo no nível de aminoácidos, ácidos orgânicos e nucleótidos. Deste modo, verificou-se que o perfil metabólico se distinguiu entre ambas as condições, pelo que, no final deste capítulo, serão discutidas as principais alterações metabólicas.

Perfil metabólico da evolução das lesões neoplásicas pancreáticas e progressão do cancro

A análise de PCA, da comparação entre os espectros pertencentes aos murganhos LG e aos murganhos HG, refletiu uma separação ao longo do segundo componente principal PC2 (Figura 3.14, A), sanlietando-se um possível *outlier* do grupo de murganhos HG (HG46). Contudo, na análise de PLS-DA esta amostra não surgiu como um *outlier*, visto que apresentou o mesmo padrão de distribuição das restantes amostras dos murganhos HG,

pelo que não foi excluída nas posteriores análises. Na análise PLS-DA as classes separaram-se ao longo de LV1 (Figura 3.14, B). A robustez do modelo foi elevada ($Q^2=0.635$), se bem que não foi tão elevada como a das duas comparações *pairwise* anteriores, o que refletiu um perfil metabólico mais semelhante entre LG e HG do que Pt e LG.

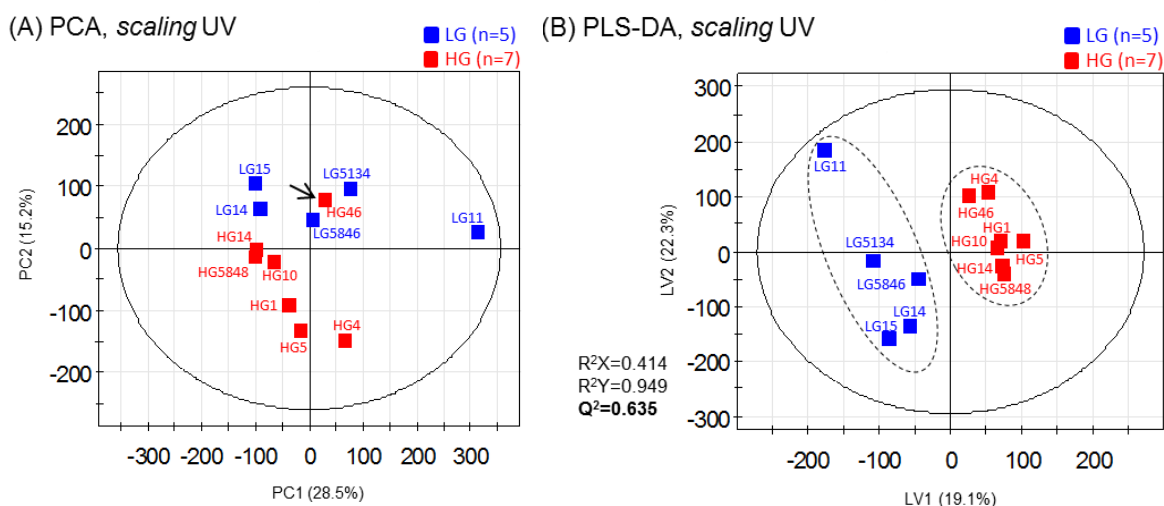


Figura 3.14 – Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA de espectros de murgancho LG e de murgancho HG.

A grande maioria dos sinais no gráfico de *loadings* (Figura 3.15) apresentou baixos valores de VIP ($VIP < 1.13$). Contudo, existiram alguns sinais que se evidenciaram com valores de VIP mais elevados, principalmente na região dos 2.00 aos 5.00 ppm. Deste modo, as lesões neoplásicas LG distinguiram-se metabolicamente das lesões neoplásicas HG pelo aumento de glutamato, aspartato, fosfocolina e AMP e pela diminuição mio-inositol, glucose e sacarose.

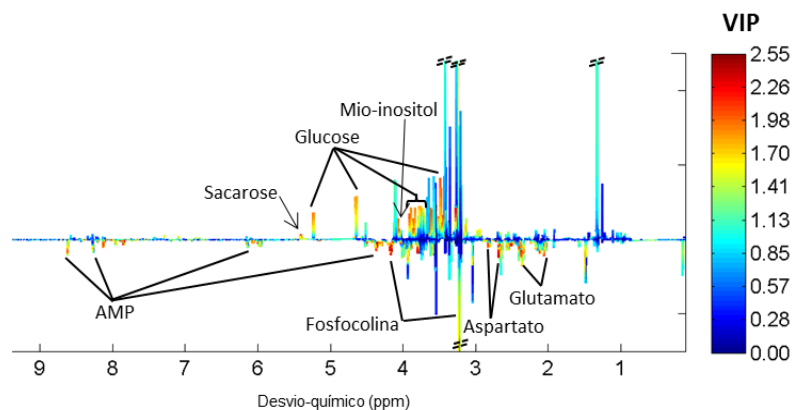


Figura 3.15 – Representação dos *loadings* de LV1 resultante da análise PLS-DA da comparação do perfil metabólico dos murgancho LG com o dos murgancho HG.

A evolução do grau de neoplasia pancreática caracterizou-se pelas seguintes variações: a) aumento de glucose, mio-inositol e sacarose e b) diminuição de 2-fosfoglicerato, AMP, aspartato, fosfocolina, glutamato, GPC, UDP-glucose/glucuronato e UMP no grupo de murganhos HG (Tabela 3.6). Como se esperava, não são muitos os metabolitos que se diferenciaram entre os dois grupos de murganhos em questão.

Tabela 3.6 - Metabolitos significativamente alterados (p -value <0.05, ES > ES erro) nas lesões LG comparativamente às lesões HG; *s*: singuleto, *d*:duplete, *dd*: duplo-duplete, *t*:tripleto, *m*:multipleto.

Identificação do metabolito		HG (n=7) vs. LG (n=5)			<i>p</i> -value
Nome	δ /ppm (multiplicidade)	ES	\pm	ES erro	
2-Fosfoglicerato	4.43 (<i>m</i>)	↓	-1.35	\pm 1.19	2.80E-02
AMP	8.60 (<i>s</i>)	↓	-1.29	\pm 1.18	2.50E-02
Aspartato	2.80 (<i>d</i>)	↓	-1.88	\pm 1.30	3.00E-02
Fosfocolina	4.15 (<i>m</i>)	↓	-2.60	\pm 1.48	7.90E-03
GPC	4.33 (<i>m</i>)	↓	-1.65	\pm 1.25	3.50E-02
Glucose	5.23 (<i>d</i>)	↑	1.38	\pm 1.20	3.90E-02
Glutamato	2.35 (<i>m</i>)	↓	-2.38	\pm 1.42	1.90E-03
Mio-inositol	4.06 (<i>t</i>)	↑	1.53	\pm 1.22	4.60E-02
Sacarose	5.41 (<i>m</i>)	↑	1.78	\pm 1.28	1.00E-02
UDP-glucose/glucuronato	7.95 (<i>d</i>)	↓	-1.74	\pm 1.27	1.80E-02
UMP	8.11 (<i>d</i>)	↓	-2.91	\pm 1.58	1.70E-04

As lesões neoplásicas LG e HG demonstraram um menor número de variações metabólicas relativamente às comparações de condições apresentadas até aqui. No entanto, estas variações afetaram várias famílias de compostos, nomeadamente ácidos orgânicos, nucleótidos, hidratos de carbono (açúcares) e compostos de colina, sendo que serão discutidas no final deste capítulo.

Na análise de PCA das classes PDA vs. HG pareceu existir uma ligeira tendência para uma separação entre ambas as classes, ao longo do primeiro componente principal PC1 (Figura 3.16, A). Salientam-se dois possíveis *outliers* (setas), os quais se confirmaram após a análise de PLS-DA (Figura 3.16, B). No entanto, estas amostras não foram excluídas de análises posteriores, pois o número de amostras de ambas as classes não era muito elevado. Na análise de PLS-DA existiu uma tendência de separação ao longo do componente LV1 mas também do LV2, mas a robustez não foi muito elevada ($Q^2=0.304$). Futuramente, a análise deveria ser repetida, excluindo as amostras outliers e aumentando o número de amostras, preferencialmente.

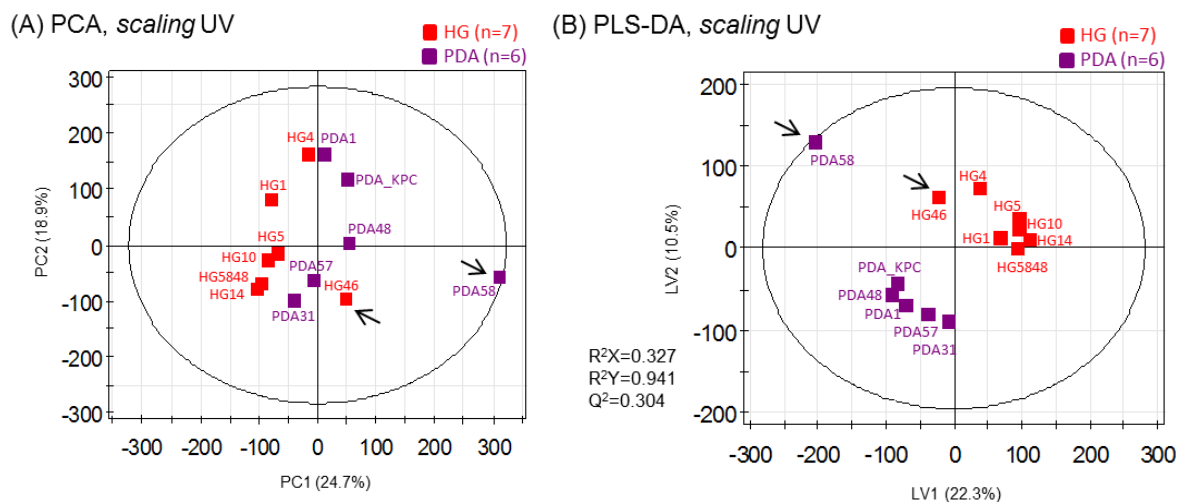


Figura 3.16 – Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA de espectros de murganços HG e de murganços PDA.

Dos dois possíveis componentes a escolher para a projeção dos *loadings*, escolheu-se o componente LV1, visto que na análise PCA era também no componente PC1 onde a separação entre grupos era mais notória (Figura 3.17). Deste modo, o perfil metabólico do PDA, comparativamente ao perfil metabólico das lesões neoplásicas HG, distinguiu-se, sobretudo, por um aumento de lactato e uma diminuição de glucose, verificando-se que a variação de glucose contribui de forma mais relevante para a separação dos grupos de murganços ($2.04 < \text{VIP} < 2.63$).

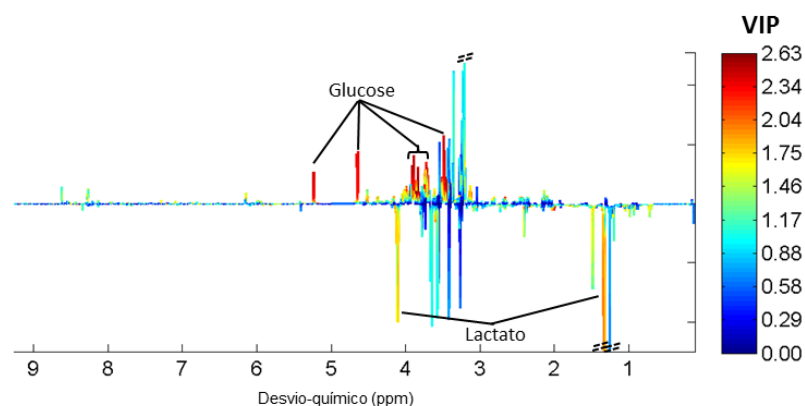


Figura 3.17 – Representação dos *loadings* de LV1 resultante da análise PLS-DA da comparação do perfil metabólico dos murganços HG com o dos murganços PDA.

A UVA permitiu compreender, mais concretamente, que o tumor PDA distinguiu-se metabolicamente das lesões neoplásicas HG através das seguintes alterações: a) aumento de 3-HBA, 3-HIBA, alanina, lactato e prolina no grupo de murganços PDA e b)

diminuição significativa de ascorbato, fosfoetanolamina e glucose no grupo de murganhos PDA (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Metabolitos significativamente alterados ($p\text{-value} < 0.05$, $ES > ES\text{ erro}$) na distinção das lesões HG relativamente ao PDA; d :dupleteo, m :multipleteo.

Identificação do metabolito		PDA (n=6) vs. HG (n=7)			$p\text{-value}$
Nome	δ /ppm (multiplicidade)	ES	\pm	ES erro	
3-HBA	1.20 (d)	↑	1.31	\pm 1.13	5.00E-02
3-HIBA	1.11 (d)	↑	1.17	\pm 1.11	2.20E-02
Alanina	1.48 (d)	↑	1.17	\pm 1.11	3.50E-02
Ascorbato	4.51 (d)	↓	-1.16	\pm 1.11	4.20E-02
Fosfoetanolamina	3.98 (m)	↓	-2.20	\pm 1.32	1.30E-03
Glucose	5.23 (d)	↓	-3.10	\pm 1.56	2.30E-03
Lactato	1.33 (d)	↑	1.62	\pm 1.19	1.70E-02
Prolina	1.99 (m)	↑	1.76	\pm 1.22	1.40E-02

Os perfis metabólicos de ambas as condições em estudo não foram muito diferentes, contudo, as variações ocorrem em diferentes famílias de compostos. Estas variações serão discutidas no final do capítulo.

Na análise de PCA dos grupos PDA vs. Sarc existiu uma subtil separação dos grupos de murganhos ao longo de PC1 (Figura 3.18, A), no entanto existiram quatro amostras que afetaram a completa separação amostral (setas no gráfico de *scores*). Na análise de PLS-DA (Figura 3.18, B) estas amostras não se destacaram como *outliers*, pelo que não se excluíram de análises posteriores. Nesta última análise não houve uma separação explícita ($Q^2=0.192$) dos dois grupos de murganhos, mas verificou-se uma tendência de separação, principalmente ao longo de LV1. Assim, pareceu haver pouca divergência em termos do perfil metabólico dos dois tipos de tumores pancreáticos em estudo.

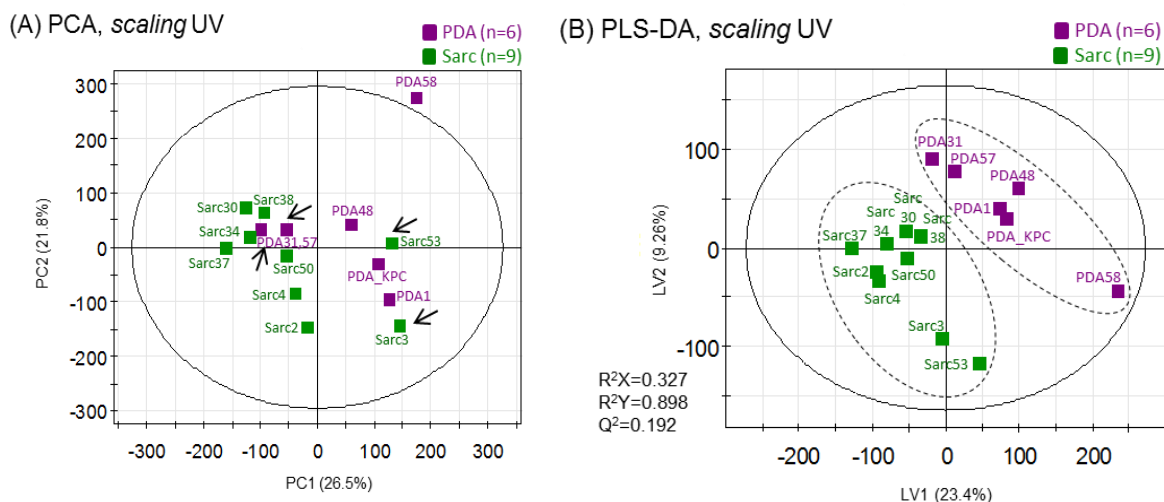


Figura 3.18 – Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA de espectros de murganhos PDA e de murganhos Sarc.

De acordo com a baixa robustez do modelo associado à análise PLS-DA, a grande maioria dos sinais do gráfico da projeção dos *loadings* de LV1 apresentou valores de VIP muito baixos ($VIP < 1.19$) (Figura 3.19). Desta forma, o PDA distinguiu-se metabolicamente do Sarc através da diminuição de alanina e AMP, sendo que este último metabolito pareceu ter um papel de maior contribuição para a separação dos grupos.

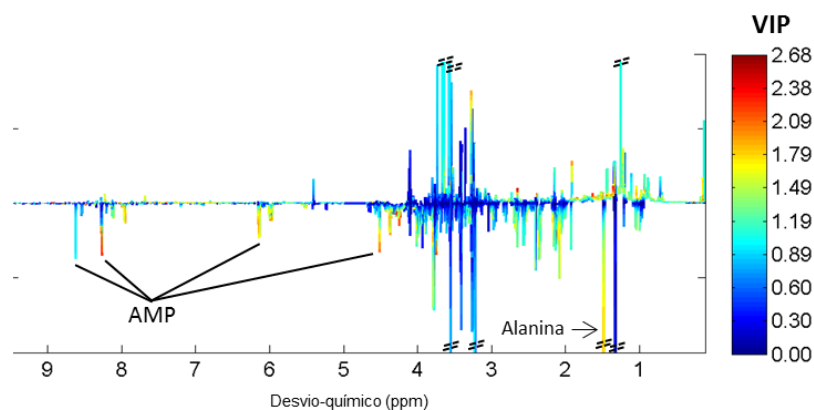


Figura 3.19 – Representação dos *loadings* de LV1 resultante da análise PLS-DA da comparação do perfil metabólico dos murganhos PDA com o dos murganhos Sarc.

Com a UVA verificou-se que o PDA se distinguiu do Sarc através, apenas, do aumento do duplete a 7.95 ppm pertencente ao metabolito UDP-glucose/glucuronato ($ES \pm ES \text{ erro} = 1.19 \pm 1.06$, $p\text{-value} = 1.70E-02$). Como tal, comprovou-se que os perfis metabólicos dos dois tipos de cancros pancreáticos são muito semelhantes, o que dificulta a descoberta de biomarcadores metabólicos que classifiquem e distingam os tumores em questão.

3.2.4. Análise global e discussão do metabolismo de murganhos com pancreatite e KRAS

Para consolidar o estudo sobre o efeito do oncogene KRAS no desenvolvimento da pancreatite e na progressão das lesões malignas pancreáticas, as variações metabólicas encontradas (Tabelas 3.3-3.8) serão representadas na forma de gráfico, para melhor ilustrar a trajetória dos metabolitos ao longo dos diferentes grupos.

A Figura 3.20 mostra a evolução dos níveis de aminoácidos. Observou-se uma trajetória semelhante entre alguns aminoácidos, como por exemplo, a alanina e prolina, a histidina e lisina, a fenilalanina e glutamina e, ainda, a tirosina e creatina. Salientou-se uma evidente barra de erro (desvio-padrão) em todos os aminoácidos para a condição Sarc, pelo que esta não foi considerada para avaliar a progressão do carácter maligno das lesões pancreáticas.

O desenvolvimento da pancreatite comparativamente ao tecido saudável caracterizou-se pelas seguintes alterações: a) diminuição de alanina, histidina, tirosina, valina e creatina e, ainda, uma tendência para a diminuição de lisina e prolina; b) aumento de fenilalanina e uma tendência para o aumento de aspartato, glutamina e leucina. Em segundo lugar, as variações entre a pancreatite aguda e as lesões neoplásicas LG caracterizaram-se por: a) diminuição de glutamina, leucina e creatinina e, ainda, uma tendência para a diminuição de fenilalanina, histidina, lisina e tirosina; b) aumento de alanina e uma tendência para o aumento de aspartato. Em suma, o perfil metabólico do tecido com pancreatite foi discriminado do tecido saudável e com lesões neoplásicas LG por uma tendência de aumento de fenilalanina, glutamina, leucina e de diminuição de creatina. Contudo, salienta-se a diminuição de alanina no tecido com pancreatite, pois foi importante para a distinção desta patologia, visto que se encontrava aumentada para as restantes condições em estudo. Por último, a progressão do carácter maligno das lesões pancreáticas caracterizou-se por uma tendência para a diminuição de aspartato, glutamina e tirosina e para o aumento de alanina, lisina e valina. Os restantes aminoácidos (fenilalanina, histidina, leucina, creatina e creatinina) exibiram níveis relativamente constantes ao longo desta progressão. Um último aspeto a notar é o facto da decrescente trajetória da tirosina ter coincidido com a presença e a progressiva gravidade das patologias pancreáticas, de um modo geral.

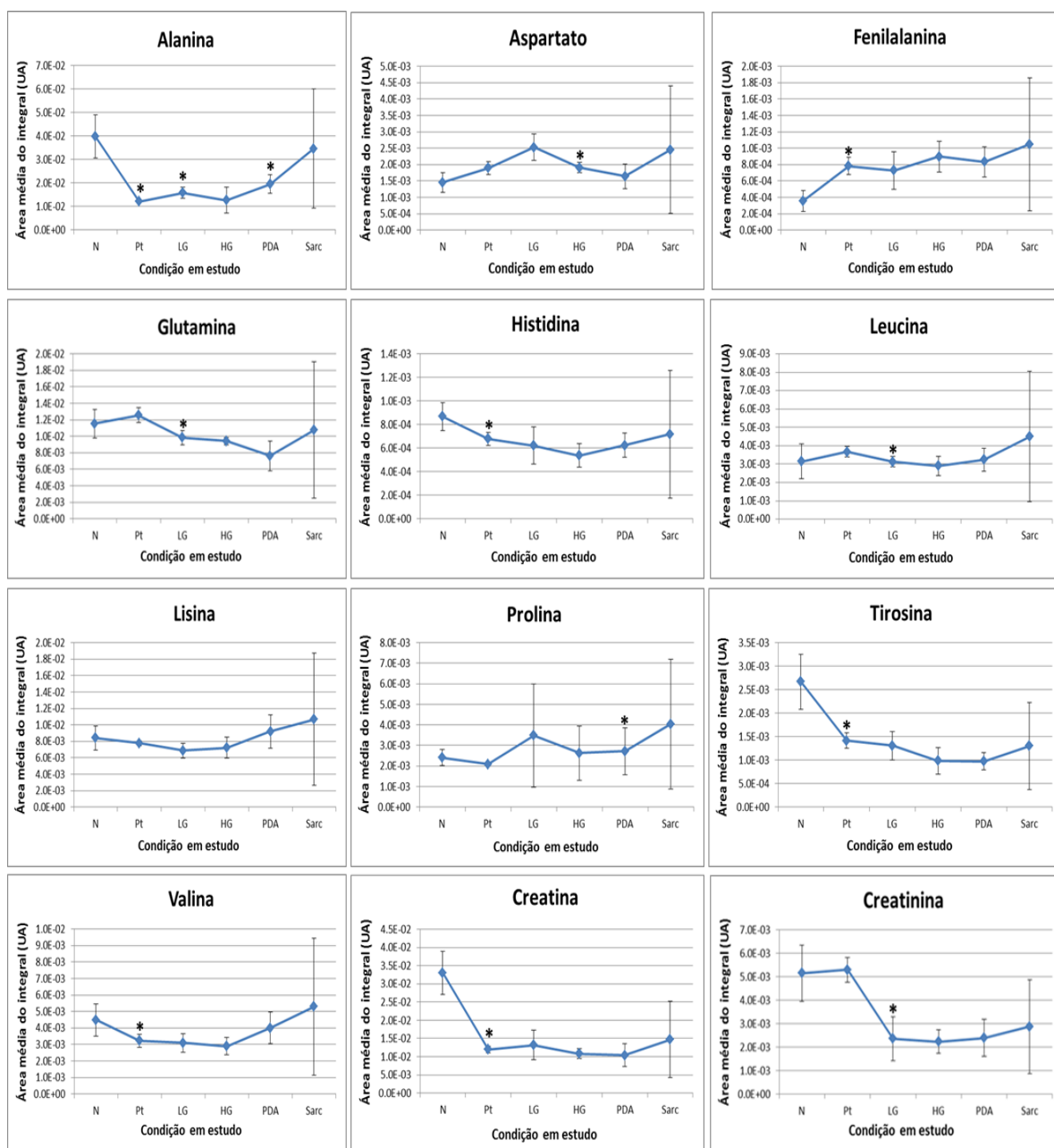


Figura 3.20 – Níveis de aminoácidos e compostos derivados alterados entre o metabolismo das várias classes de murganinhos estudados; o “*” representa as variações, relativas ao grupo anterior, com um *p-value* <0.05.

Quanto à trajetória da família dos ácidos orgânicos (Figura 3.21) evidenciou-se uma barra de erro maior nas condições patológicas comparativamente à condição N (*e.g.* fenilacetato, formato, tirosina e TMAO), o que é coerente com a heterogeneidade dos tecidos nessas mesmas condições, sobretudo nas de carácter maligno (120).

O desenvolvimento da pancreatite apresentou as seguintes variações: a) diminuição de formato e fumarato e tendência de diminuição de 3-HIBA, 3-HIVA, ascorbato, lactato, succinato e TMAO; b) aumento de fenilacetato, GSH e taurina e uma tendência de aumento de 2-fosfoglicerato e glutamato. A evolução da pancreatite para lesões neoplásicas LG caracterizou-se por: a) diminuição de fenilacetato e GSH e, ainda, uma tendência para a diminuição de 2-fosfoglicerato; b) aumento de succinato e tendência para o aumento de formato, fumarato e glutamato. Em terceiro lugar, a progressão do carácter maligno das patologias em questão definiu-se por: a) tendência para a diminuição de 2-fosfoglicerato, glutamato e succinato; b) aumento de 3-HBA e lactato. Contudo, vários ácidos orgânicos apresentaram níveis minimamente constantes: 3-HIBA, 3-HIVA, fenilacetato e, ainda, formato, fumarato, GSH, taurina e TMAO.

Neste sentido, conclui-se que o perfil do tecido com pancreatite apresentou diferenças metabólicas notórias relativamente aos tecidos das restantes condições. Assim, o perfil metabólico da pancreatite descreveu-se através de uma diminuição de formato e fumarato e, contrariamente, através de um aumento de fenilacetato e GSH. Para terminar, o tecido das várias patologias com carácter maligno progressivo distinguiu-se do tecido saudável e com pancreatite através da diminuição de 2-fosfoglicerato e glutamato e do aumento de 3-HBA.

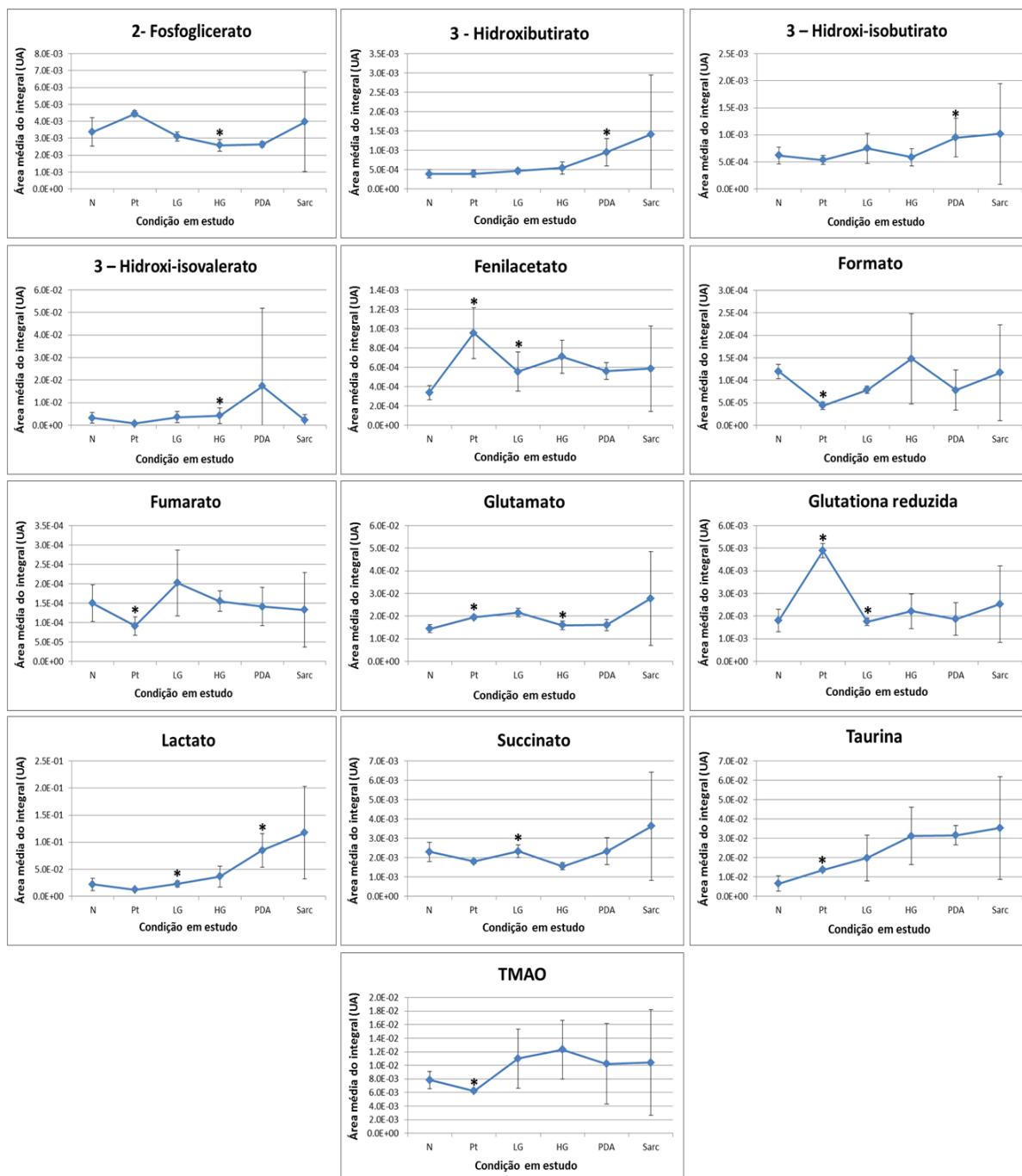


Figura 3.21 - Níveis de ácidos orgânicos alterados entre o metabolismo das várias classes de murganços estudados; o ‘*’ representa as variações, relativas ao grupo anterior, com um p -value < 0.05.

No caso dos compostos de colina e da fosfoetanolamina observaram-se barras de erro mais pequenas no caso das condições patológicas, com excepção da Sarc (Figura 3.22). O perfil da pancreatite descreveu-se por: a) diminuição de fosfocolina e GPC e uma tendência de diminuição de fosfoetanolamina. A evolução de pancreatite para lesões neoplásicas caracterizou-se por: a) diminuição de fosfocolina e b) pelo aumento de GPC e, ainda, uma tendência para o aumento de fosfoetanolamina. A progressão do carácter maligno caracterizou-se pela diminuição de todos os metabolitos. Este fenómeno pode representar a necessidade do uso deste tipo de compostos para a formação de novas membranas celulares, visto que existe uma contínua divisão celular à medida que as patologias progridem, sobretudo nos tecidos tumorais (130). Em suma, o desenvolvimento e evolução das patologias pancreáticas definiu-se através da diminuição crescente de fosfocolina. A diminuição de fosfoetanolamina e GPC foi indicativa da progressão das lesões pancreáticas de carácter maligno, principalmente aquela que ocorre neste último composto, visto que os seus níveis se mantiveram minimamente constantes nos tecidos saudáveis e com pancreatite.

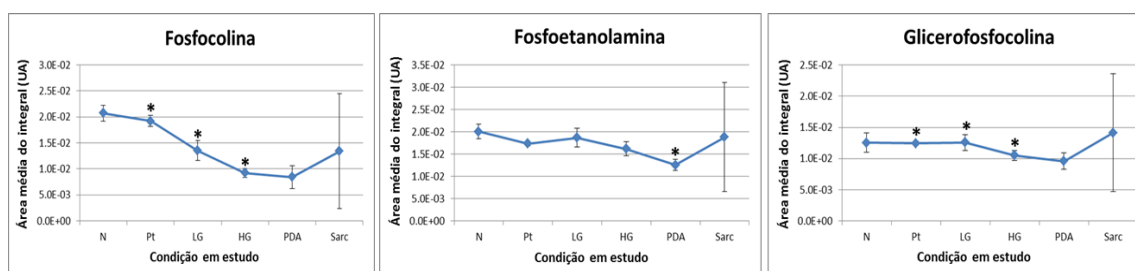


Figura 3.22 – Níveis de compostos de colina e fosfoetanolamina entre o metabolismo de murganços com pancreatite aguda e murganços KRAS com várias patologias pancreáticas desenvolvidas; o ‘*’ representa as variações, relativas ao grupo anterior, com um *p-value* <0.05.

No caso dos hidratos de carbono, em primeiro lugar, é notório que a glucose e a sacarose apresentaram uma barra de erro mais elevada para as patologias de carácter maligno (Figura 3.23). Em segundo lugar, destacou-se um perfil semelhante entre ambos os açúcares: a) uma inicial tendência de aumento com o desenvolvimento e progressão das patologias pancreáticas não tumorais; b) uma diminuição de glucose no e uma tendência de diminuição de sacarose no tumor PDA.

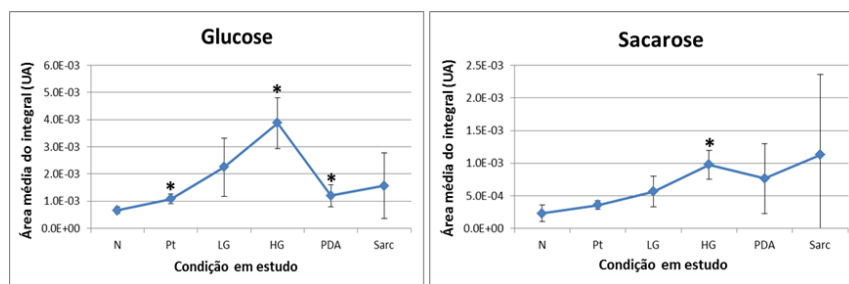


Figura 3.23 - Níveis dos hidratos de carbono entre o metabolismo de murganhos com pancreatite aguda e murganhos KRAS com várias patologias pancreáticas desenvolvidas; o ‘*’ representa as variações, relativas ao grupo anterior, com um *p-value* <0.05.

Quanto aos nucleótidos e compostos derivados, verificou-se que os níveis de ADP se mantiveram constantes ao longo da evolução das patologias pancreáticas, devido à presença das elevadas barras de erro (Figura 3.24). O desenvolvimento da pancreatite caracterizou-se por: a) diminuição de AMP, UDP-NAG; UMP; b) aumento de ATP e uma tendência para o aumento de UDP-Glucose ou -Glucuronato. A evolução de pancreatite em lesões neoplásicas LG caracterizou-se por: a) diminuição de ATP, UDP-Glucose ou -Glucuronato e NAD^+ e pela tendência de diminuição de UDP-NAG; b) aumento de AMP e UMP. Em último lugar, a progressão do carácter maligno das patologias caracterizou-se por: a) diminuição de AMP, UDP-Glucose ou -Glucuronato e uma tendência de diminuição de UDP-NAG e UMP. Os níveis de ATP e NAD^+ tiveram de ser considerados constantes, devido à elevada barra de erro existente para as condições LG, HG, PDA e Sarc. Em síntese, o desenvolvimento da pancreatite distinguiu-se da sua progressão através da diminuição de AMP e UMP. O perfil do tecido com pancreatite diferenciou-se, ainda, de todos os restantes através do aumento de ATP e tendência para o aumento de UDP-Glucose ou -Glucuronato. Por outro lado, o perfil da progressão do carácter maligno das patologia identificou-se por uma diminuição de UDP-Glucose ou -Glucuronato.

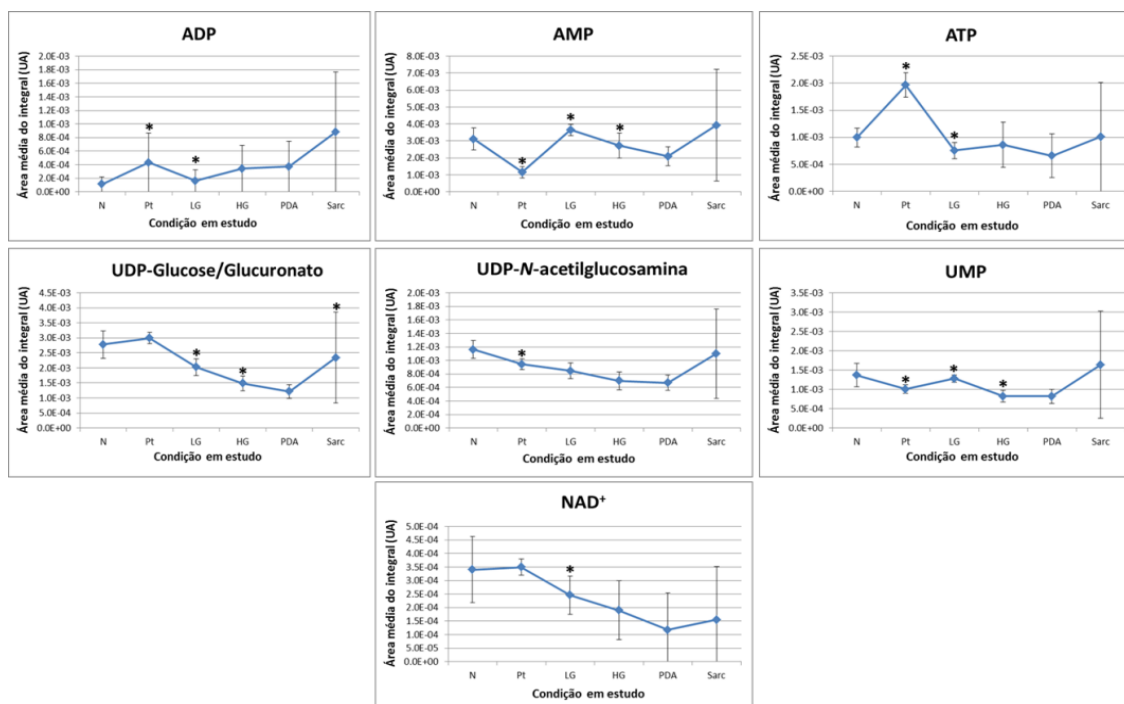


Figura 3.24 - Níveis dos nucleótidos e compostos derivados entre o metabolismo de murganços com pancreatite aguda e murganços KRAS com várias patologias pancreáticas desenvolvidas; o '*' representa as variações, relativas ao grupo anterior, com um *p-value* < 0.05.

Para terminar, resta a análise dos níveis de vitaminas e compostos derivados (Figura 3.25). O desenvolvimento da pancreatite descreveu-se pela diminuição de niacinamida e pela tendência para o aumento de mio-inositol, sendo que os níveis de ascorbato se mantiveram minimamente constantes. A sua evolução, para leões neoplásicos LG, caracterizou-se pela diminuição de niacinamida, pelo aumento de mio-inositol e, ainda, pela tendência de aumento do ascorbato. Por último, a progressão das patologias malignas descreveu níveis minimamente constantes para todos os compostos, visto que as possíveis variações observadas foram anuladas pelas barras de erro elevadas nas condições LG, HG, PDA e Sarc. No caso desta família de compostos, o perfil do tecido pancreático destacou-se pela diminuição de niacinamida, sendo que esta apresentou níveis minimamente constantes para as restantes condições e estudo. Por outro lado, o tumor PDA caracterizou-se pela tendência para a diminuição de ascorbato e mio-inositol relativamente às restantes patologias pancreáticas.

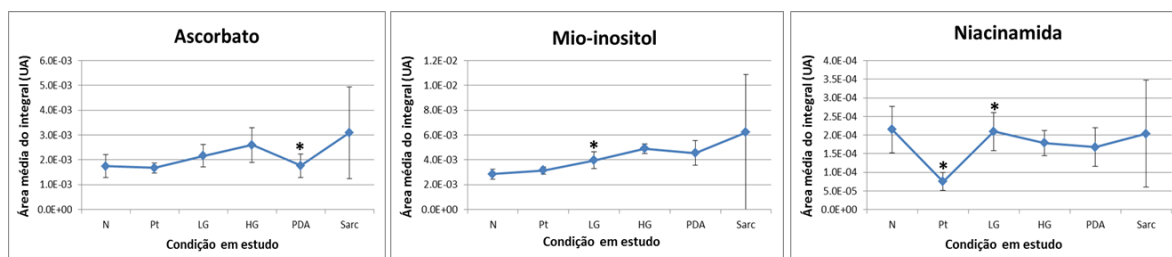


Figura 3.25 - Níveis das vitaminas entre o metabolismo de murganhos com pancreatite aguda e murganhos KRAS com várias patologias pancreáticas desenvolvidas; o ‘*’ representa as variações, relativas ao grupo anterior, com um $p\text{-value} < 0.05$.

Na Figura 3.26 sumarizam-se as variações mais notórias, em termos de trajetória dos metabolitos, que permitiram identificar e distinguir o perfil metabólico do tecido com pancreatite do tecido saudável e, ainda, distinguir este primeiro do tecido com lesões neoplásicas LG. Recorda-se, no entanto, que as variações destacadas nas Tabelas 3.3 e 3.5 foram também identificativas das condições anteriormente referidas, respetivamente.

Pt vs. N			Pt vs. LG		
Metabolito	ES	$p\text{-value}$	Metabolito	ES	$p\text{-value}$
Alanina	-4.93	4.40E-05	Alanina	-1.71	4.50E-02
AMP	-3.79	1.50E-05	UDP-glc/glucuronato	-2.41	3.20E-03
Creatina	↓		Fenilalanina	↑	
Formato	-3.22	1.20E-03	Glutamina	2.63	1.20E-03
Fumarato	-1.46	1.50E-02	Leucina	1.59	1.90E-02
Glutamina	↓				
Leucina	↓				
Niacinamida	-2.53	8.40E-04			
UMP	-2.39	7.30E-04			
ATP	4.67	1.50E-05			
Fenilacetato	3.02	2.60E-03			
Fenilalanina	↑				
Glutathiona	7.70	1.20E-03			

Figura 3.26 – Principais alterações metabólicas detetadas na trajetória dos metabolitos para o tecido com pancreatite relativamente ao tecido saudável (Pt vs. N) e ao tecido com lesões neoplásicas LG (Pt vs. LG).

O perfil do tecido com pancreatite foi bastante característico e apresentou algumas particularidades que permitiram distingui-lo não só em termos de desenvolvimento e evolução para lesões neoplásicas LG, mas também relativamente às patologias com

carácter maligno progressivo. Das alterações mencionadas na Figura 3.26, é importante destacar aquelas que ocorreram em termos de alanina e de GSH, pois foram aquelas que melhor diferiram o perfil da pancreatite das restantes condições.

A diminuição da alanina no tecido com pancreatite poderá resultar do maior fluxo do processo de transaminação, até porque os níveis de glutamato apresentaram uma tendência para aumentar (Figuras 3.19 e 3.20). O possível aumento do fluxo deste processo representa um aumento do ritmo de conversão da alanina em piruvato, permitindo que exista piruvato disponível para satisfazer a maior necessidade energética que as células apresentam. Salienta-se que a obtenção de ATP, muito provavelmente, não resultará da fermentação láctea, pois verificou-se uma tendência de diminuição de lactato no tecido com pancreatite relativamente aos tecidos das restantes condições em estudo (Figura 3.20). Por outro lado, o ciclo TCA também não será a possível via metabólica a partir da qual esteja a ser obtido ATP, pois o seu fluxo também parece estar diminuído, o que se refletiu através da diminuição de fumarato e pela tendência de diminuição do succinato.

O aumento da GSH poderá indicar um possível padrão característico da pancreatite, visto que este metabolito se manteve minimamente constante ao longo das restantes condições em estudo. O facto destes níveis se terem mantido constantes para as condições de carácter maligno são concordantes com um estudo da literatura que provou que a inativação do oncogene KRAS não promovia alterações nos níveis de GSH e/ou GSSG (107).

A diminuição da creatina foi uma variação metabólica que distinguiu claramente o tecido pancreático saudável daquele afetado com pancreatite. Contudo, as variações deste metabolito entre os tecidos afetados com pancreatite e aqueles afetados pelas condições neoplásicas não foram discriminatórias, pois os níveis de creatina mantiveram-se igualmente baixos para as condições neoplásicas. Neste caso, a diminuição de creatina foi acompanhada pela tendência do aumento de creatinina, o que poderá sugerir que a creatina estará a ser convertida em creatinina. Na literatura, os níveis plasmáticos de creatinina estudaram-se para averiguar a sua possível relação com a progressão da necrose pancreática em indivíduos com pancreatite aguda. No entanto, este é um assunto controverso, visto que os estudos chegaram a conclusões antagónicas: um dos estudos defendeu que o aumento dos níveis plasmáticos de creatinina, nas primeiras 48h, é

indicativo de necrose pancreática, apontando este metabolito como um possível biomarcador identificativo de pancreatite (131); um outro estudo defendeu precisamente o contrário, no entanto descreveram que caso os níveis plasmáticos de creatinina se mantiverem, é pouco provável que se observe necrose pancreática (132). Por outro lado, foram ainda reportados dois casos de pacientes com pancreatite aguda que apresentavam uma elevada atividade plasmática de creatina cinase, a enzima responsável pela fosforilação da creatina em fosfocreatina (132). Deste modo, sugere-se que a creatina diminui, pois poderá estar a ser convertida em creatinina e/ou fosforilada a fosfocreatina, o que é coerente com a elevada disponibilidade de ATP observada. No entanto, a finalidade molecular/celular não é conhecida.

A diminuição de AMP e o aumento de ATP foram variações metabólicas controversas em termos de biossíntese, visto que o AMP pode ser obtido através da reação de hidrólise do ATP ($\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AMP} + \text{PPi}$). Deste modo, sugere-se que a razão AMP/ATP relaciona-se com a regulação da atividade da enzima proteína cinase ativada por AMP (*AMP-activated protein kinase*, AMPK). Salienta-se que esta enzima é regulada alostericamente pela ligação de AMP ou ADP, sendo que o ATP é uma molécula que inibe competitivamente a ligação dos nucleótidos anteriormente referidos (133). Deste modo, as variações no AMP e ATP refletiram uma possível inibição da enzima AMPK, o que vem ao encontro de estudos que descrevem que esta enzima se encontra inibida em processos de inflamação (134), como é o caso da pancreatite.

O aumento dos aminoácidos fenilalanina e leucina não deve resultar da diminuição da biossíntese proteica, visto que os restantes aminoácidos estudados apresentaram uma tendência para diminuírem. O aumento da fenilalanina poderá resultar da inibição da biossíntese de tirosina.

A Figura 3.27 resume os metabolitos que apresentaram uma trajetória característica e distinta para a progressão do carácter maligno das patologias pancreáticas, incluindo a evolução das lesões neoplásicas PanIN LG para HG e lesões PDA ou Sarc. A progressão em causa foi também caracterizada pelos metabolitos mencionados nas Tabelas 3.4, 3.6 e 3.7.

HG vs. LG			PDA vs. HG		
Metabolito	ES	p-value	Metabolito	ES	p-value
2-fosfoglicerato	-1.35	2.80E-02	Ascorbato	-1.16	4.20E-02
3-HIBA	↓		Fosfoetanolamina	-2.20	1.30E-03
Fosfocolina	-2.60	7.90E-03	Glucose	-3.10	2.30E-03
Glicerofosfocolina	-1.65	3.50E-02	Glutamina	↓	
Glutamina	↓		Niacinamida	↓	
UDP-glc/glucuronato	-1.74	1.80E-02	Sacarose	↓	
Niacinamida	↓		Tirosina	↓	
Tirosina	↓		UDP-GlcNAc	↓	
UDP-GlcNAc	↓				
Glucose	1.38	3.90E-02	3-HBA	1.31	5.00E-02
Sacarose	1.78	1.00E-02	3-HIBA	1.17	2.20E-02
			Lactato	1.62	1.70E-02

Figura 3.27 - Principais alterações metabólicas detetadas na trajetória dos metabolitos ao longo da progressão da carcinogénese pancreática (LG-HG-PDA), provocada pela ativação do oncogene KRAS.

Um dos principais aspetos a discutir é a variação do fluxo da glicólise. Nos estudos da literatura, a progressão das lesões neoplásicas PanIN e o desenvolvimento do PDA, resultantes da ativação do oncogene KRAS em murganhos, caracterizaram-se por aumento do consumo de glucose (4,106,107). Este aumento do consumo vai ao encontro do facto das células neoplásicas apresentarem o funcionamento da glicólise exacerbado, para que consigam obter rapidamente energia que sustente a sua contínua divisão e crescimento. Neste trabalho, as variações dos metabolitos intervenientes na glicólise, glucose e 2-fosfoglicerato, foram discordante com a literatura no caso da evolução das lesões LG para as HG e concordante no caso da evolução da lesão HG para o PDA. Assim, no primeiro caso, verificou-se um aumento de glucose e uma diminuição de 2-fosfoglicerato, o que poderá refletir um menor fluxo da glicólise. No segundo caso, verificou-se uma diminuição de glucose e um aumento de 2-fosfoglicerato. Como a sacarose apresentou um perfil de trajetória semelhante à glucose, poderá estar a ser utilizada para potenciar a glicólise, através da sua decomposição em glucose e frutose (intermediários da glicólise), pela ação da enzima sacarase.

A trajetória do ascorbato e da niacinamida foi outra variação que permitiu distinguir as lesões neoplásicas do tumor, visto que a evolução das lesões LG para HG caracterizaram-se por uma tendência do aumento de ascorbato e uma diminuição de

niacinamida e a evolução das lesões HG para PDA caracterizaram-se por uma tendência contrária. Estas variações poderão ser justificadas pela oxidação do ascorbato e pela consequente libertação extracelular de peróxido de hidrogénio (135). Mais concretamente, o peróxido de hidrogénio, como representa uma espécie reativa de oxigénio, promove danos do DNA e ativa consequentemente a poli-(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1). Para a ativação desta proteína são necessários monómeros de ADP-ribose, pelo que estes são obtidos através da degradação de NAD^+ em niacinamida (136). Deste modo, a disponibilidade de NADH diminui, inibindo a oxidação de glucose, promovendo a diminuição na produção de ATP e o consequente colapso energético celular (137). Salienta-se que, neste caso, as variações dos níveis de ATP foram contrárias às variações de niacinamida, o que indica que este poderá ser o mecanismo que estará a ocorrer nas células das condições neoplásicas e tumorais.

Outro aspeto que deve ser discutido relativamente à literatura é a trajetória de UDP-GlcNAc ao longo do desenvolvimento das patologias pancreáticas. Um dos estudos encontrados na literatura provou que a inativação do oncogene KRAS promoveu uma diminuição no fluxo da via HBP, pois verificou-se uma diminuição de glucosamina-6-fosfato. Assim, neste trabalho, a ativação do oncogene KRAS deveria resultar no aumento do produto final da via HBP, a UDP-GlcNAc. Contudo, observou-se uma tendência para a diminuição deste metabolito à medida que as patologias pancreáticas progrediram (pancreatite inclusive). Este fenómeno poderá resultar do facto da UDP-GlcNAc estar a ser utilizada para a glicosilação de proteínas e lípidos, o que poderá sustentar a hipótese do aumento da síntese de ambos os compostos característico de tecidos com elevada divisão celular (138). No entanto, o funcionamento exacerbado da via HBP pode refletir-se através da diminuição dos níveis de glutamina, visto que este aminoácido poderá estar a ser consumido na reação de formação da glucosamina-6-fosfato (pela ação da enzima glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase).

A trajetória crescente do lactato com a progressão do carácter maligno das patologias reflete o efeito de Warburg, característico dos tecidos tumorais, sendo coerente com todos os estudos sobre a ativação do oncogene KRAS em murganhos. Por último, a tendência para o aumento do 3-HBA com a progressão das patologias pancreáticas pode refletir um aumento do fluxo da cetogénese (este aumento ocorre quando a beta-oxidação de ácidos

gordos promove a disponibilidade de acetil-CoA e o ciclo do TCA apresenta um fluxo diminuído).

3.3. Metabolismo de murganhos MYC e MYCKRAS como modelos animais de cancro pancreático

O efeito da ativação do oncogene MYC, individual e em conjunto com o oncogene KRAS, no metabolismo de murganhos foi estudado no âmbito desta tese. Como a ativação do oncogene MYC foi realizada através de uma solução do fármaco TAM, foi necessário compreender o efeito do TAM no metabolismo destes animais e, para tal, comparou-se o perfil metabólico dos murganhos WToil (ausência de TAM) com o dos WTtam (presença de TAM). Por curiosidade e visto existir material de estudo, decidiu verificar-se se a injeção de óleo influenciaria o metabolismo basal dos murganhos WT, pelo que se comparou o perfil metabólico dos murganhos WTcontrol com o dos WToil. Numa segunda parte, de modo a compreender qual o efeito da ativação individual do oncogene MYC, comparou-se o perfil metabólico dos murganhos MYCoil com o dos MYCtam. Por último, para compreender o efeito da ativação conjunta deste oncogene com o oncogene KRAS, comparou-se o perfil metabólico dos MYCRASoil com o dos MYCRAStam. A estratégia de análise dos dados foi semelhante àquela apresentada no capítulo anterior.

3.3.1. Efeito de óleo alimentar e de tamoxifen em murganhos *Wild-type*

O objetivo deste capítulo é, sobretudo, compreender o possível efeito do fármaco tamoxifen no metabolismo dos murganhos WT. No entanto, primeiro é preciso verificar-se a possibilidade da presença do óleo mascarar informação relevante nos espetros de RMN.

Efeito de óleo alimentar

Através da análise do espetro de RMN de ^1H , verificou-se que o óleo alimentar (girassol) utilizado possuía uma constituição à base de ácidos gordos (região 0.50-2.5 ppm e 5.50 ppm) e triacilglicerídeos (região 4.00-4.25 ppm) (Figura 3.28). Segundo a literatura, este tipo de óleo apresenta uma constituição rica em ácidos gordos, nomeadamente ácido palmítico (16:0) e ácido esteárico (12.5% de ambos), ácido oleico (20.0%), ácido linoleico (66.0%) e vestígios de ácido α -linolénico (0.1%) (139,140). Como tal, tornou-se necessário compreender se a presença do óleo mascarava informação relevante nos espetros de RMN dos extratos lipídicos, inviabilizando a sua análise. De forma a contornar esta problemática, caso seja verificada, podem identificar-se as regiões espectrais livres da influência do óleo, através da comparação do perfil metabólico dos murganhos WTcontrol

(sem injeção de óleo) com o dos murganhos WToil (com injeção de óleo). Além disso, pode assumir-se uma quantidade comparável de óleo nas amostras e consequentemente, ao efetuar a análise MVA, este efeito é anulado (pois não representa uma variável entre classes de amostras diferentes).

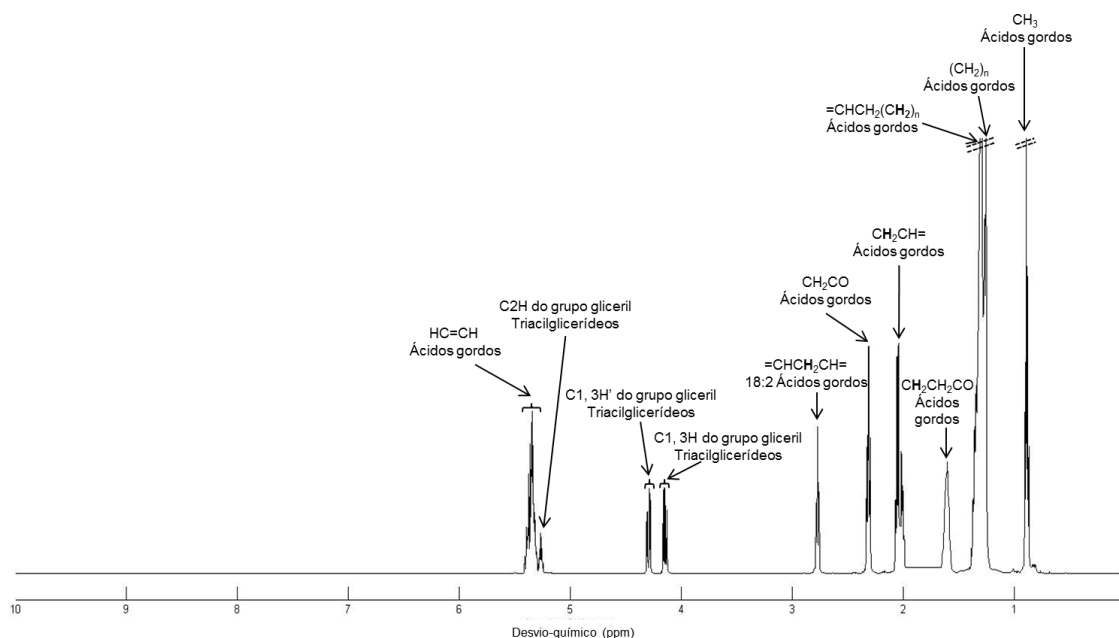


Figura 3.28 – Espectro de RMN de ^1H do óleo de girassol utilizado na preparação da solução de TAM para administração nos murganhos e consequente ativação do oncogene MYC.

Para identificar as regiões espectrais relevantes e livres da presença do óleo, primeiro, analisaram-se os extratos lipídicos e, posteriormente, analisaram-se os extratos aquosos para compreender a possível interferência das alterações lipídicas nas vias metabólicas de compostos polares. Com a comparação visual do espectro médio dos murganhos WTcontrol com o dos WToil (Figura 3.29), verificou-se que o perfil metabólico de ambos os grupos era semelhante. Nos murganhos WToil observaram-se alterações na intensidade dos seguintes sinais: grande diminuição daqueles percentes ao colesterol livre ou esterificado (região 0.60-1.00 ppm) e, ainda, à fosfatilcolina (3.31 ppm); aumento dos pertencentes a ácidos gordos, com maior destaque para aqueles compreendidos na região 2.00-2.40 ppm, e aos triacilglicerídeos (região 4.10-5.30 ppm). Deste modo, verificou-se que a presença do óleo promoveu o aumento dos lípidos que fazem parte da sua constituição.

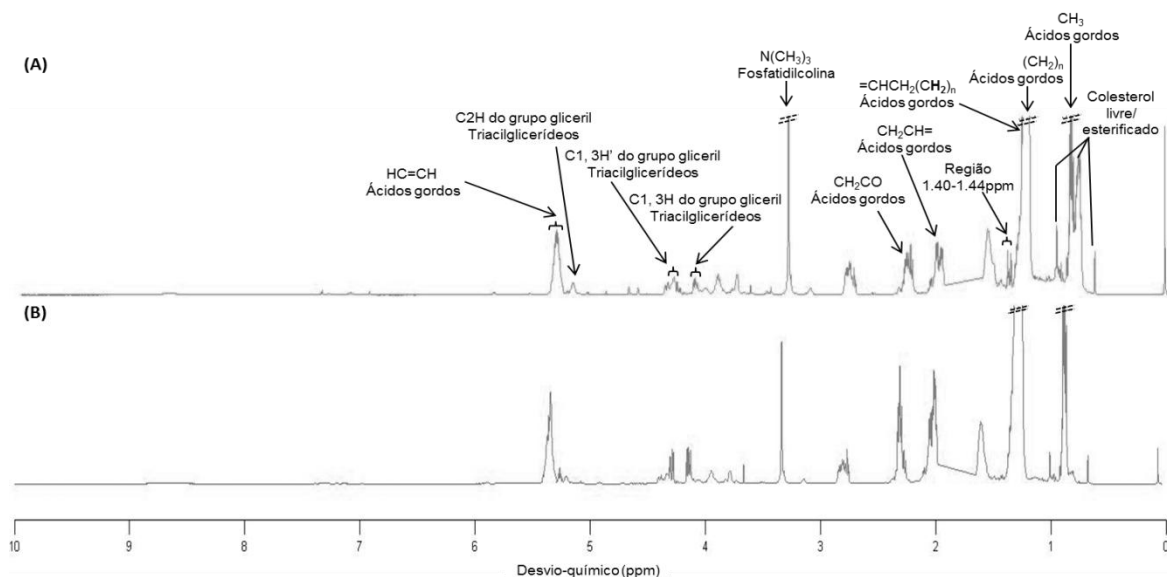


Figura 3.29 – Espetro de RMN de ^1H médio de extratos lipídicos de pâncreas de murganhos WTcontrol (A) e WToil (B).

A análise MVA suportou as diferenças do perfil espectral entre os grupos de murganhos, pois em ambas as análises, PCA e PLS-DA, verificou-se uma separação entre os grupos ao longo de PC1 e LV1 ($Q^2=0.682$), respetivamente (Figura 3.30). Assim, a presença do óleo no pâncreas de murganhos WToil foi evidenciada.

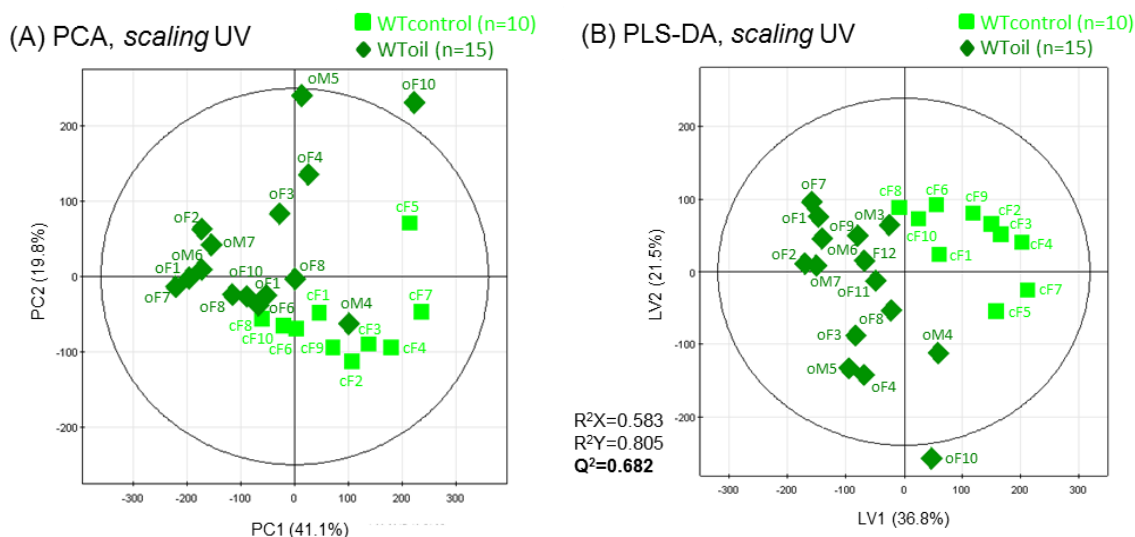


Figura 3.30 – Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA de espectros de extratos lipídicos de murganhos WTcontrol e murganhos WToil.

Conforme se observa na Figura 3.31, existiu uma total sobreposição entre os sinais negativos do gráfico de *loadings* e o perfil do espectro de RMN de ^1H do óleo alimentar puro (linha preta), o que confirmou seguramente a presença do óleo no pâncreas de

murganhos WToil. Deste modo, apenas os sinais positivos foram considerados para posterior análise UVA, pois representaram metabolitos que não resultaram da influência do óleo, encontrando-se diminuídos no grupo de murganhos WToil.

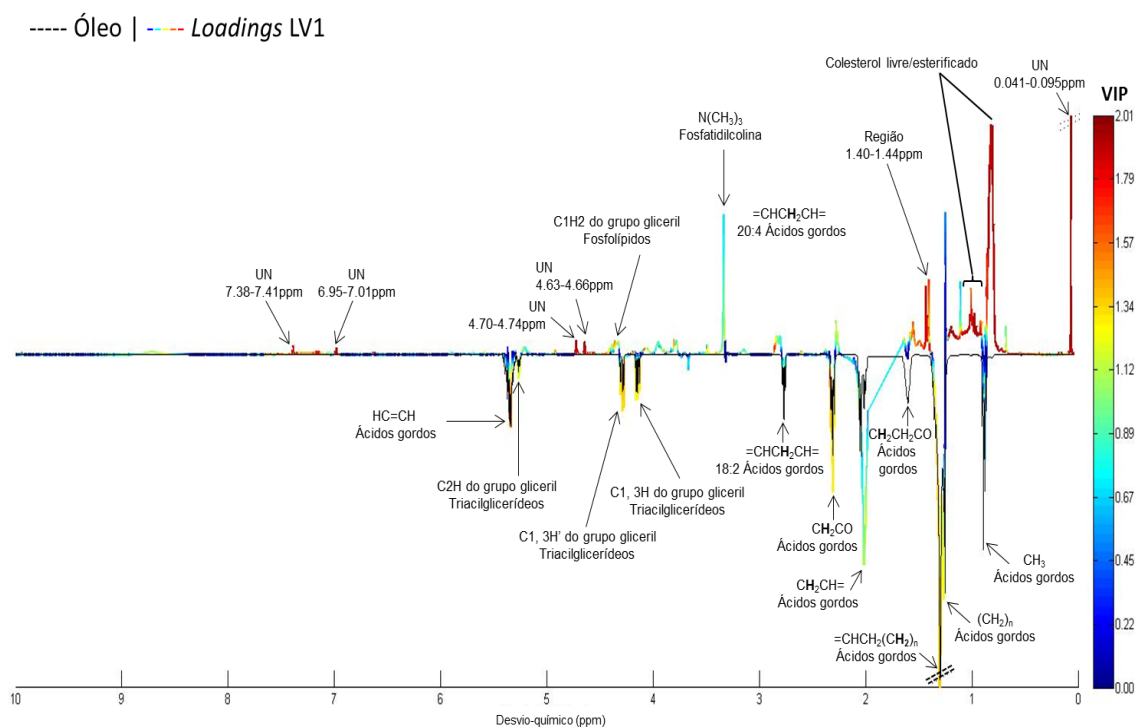


Figura 3.31 – Comparação entre o perfil dos sinais negativos da representação de *loadings* de LV1, resultantes da análise PLS-DA de espectros de extratos lipídicos de murganhos WTcontrol e WToil, e o espectro de RMN de ^1H do óleo alimentar (girassol).

O perfil metabólico dos murganhos WToil caracterizou-se pela diminuição de colesterol livre e/ou esterificado, fosfatidiletanolamina (grupo $-\text{NH}_3$ da colina) e fosfolípidos (grupo $-\text{C}_1\text{H}_2$ do grupo gliceril, fosfatidilcolina e esfingomielina) (Tabela 3.9). Para além destes metabolitos, encontram-se também diminuídos vários sinais e algumas regiões, os quais ainda não foram identificados.

Assim, com a análise dos extratos lipídicos verificou-se que a presença do óleo teve um forte impacto no metabolismo basal lipídico dos murganhos WT C57BL/6, mascarando realmente a presença de vários lípidos pertencentes à constituição do pâncreas destes animais quando saudáveis (*e.g.* ácidos gordos e triacilglicerídeos). No entanto, foi possível identificar várias regiões espectrais relevantes e que não foram influenciadas pela presença de óleo, pelo que a sua análise é importante para compreender alterações metabólicas resultantes de processos celulares.

Tabela 3.9 - Metabolitos significativamente alterados (p -value <0.05, ES > ES erro) no metabolismo lipídico de murganinhos WT C57BL/6; UN-unknown; *s*: singuleto, *d*:dupleto, *dd*:duplo-dupleto, *t*:tripleto, *m*:multiplete, *br*: largo

Identificação do metabolito		WToil (n=15) vs. WTcontrol (n=10)				<i>p-value</i>
Nome	δ/ppm (multiplicidade)	ES	±	ES erro		
Colesterol esterificado (C3H)	4.54-4.63 (<i>m</i>)	↓	-2.44	± 1.05	1.65E-04	
Colesterol livre (C3H)	3.50-3.56 (<i>m</i>)	↓	-0.952	± 0.843	1.65E-04	
Colesterol livre ou esterificado	0.70-0.85 (<i>br</i>)	↓	-3.68	± -7.21	2.45E-06	
Colesterol livre ou esterificado	0.91-0.92 (<i>s</i>)	↓	-2.59	± 1.08	1.15E-03	
Fosfatidiletanolamina (-NH ₃ ⁺)	8.07-9.00 (<i>br</i>)	↓	-1.35	± 0.884	1.84E-05	
Fosfolípidos (-C1H ₂ gliceril)	4.36-4.44 (<i>br</i>)	↓	-1.42	± 0.892	3.08E-02	
Fosfolípidos (fosfatidilcolina e esfingomielina)	3.60-3.88	↓	-0.700	± 0.823	1.63E-02	
Região 1	1.40-1.44	↓	-3.21	± -6.30	2.33E-03	
Região 2	6.97-7.00	↓	-3.70	± 1.30	5.43E-03	
UN 1	0.041-0.095	↓	-4.24	± -8.31	6.12E-07	
UN 2	0.15-0.16 (<i>s</i>)	↓	-4.42	± -8.66	3.58E-05	
UN 3	0.18-0.19 (<i>s</i>)	↓	-3.75	± -7.34	1.22E-06	
UN 4	0.64-0.65 (<i>s</i>)	↓	-2.53	± -4.96	1.84E-05	
UN 5	2.58-2.63 (<i>t</i>)	↓	-1.21	± -2.37	5.32E-04	
UN 6	4.02-4.09 (<i>br</i>)	↓	-1.30	± 0.878	1.36E-02	
UN 7	4.44-4.50 (<i>t</i>)	↓	-2.17	± 1.00	1.47E-03	
UN 8	4.63-4.66 (<i>s</i>)	↓	-3.81	± 1.32	4.10E-05	
UN 9	4.67-4.69 (<i>s</i>)	↓	-1.06	± 0.853	1.22E-06	
UN 10	4.70-4.74 (<i>d</i>)	↓	-3.61	± 1.28	2.91E-03	
UN 11	4.89-4.95 (<i>m</i>)	↓	-1.05	± 0.851	2.45E-06	
UN 12	5.58-5.59 (<i>s</i>)	↓	-1.16	± 0.862	1.47E-03	
UN 13	5.63-5.83 (<i>br</i>)	↓	-0.614	± 0.818	1.63E-02	
UN 14	6.38-6.39 (<i>d</i>)	↓	-2.12	± 0.993	7.34E-06	
UN 15	6.51-6.52 (<i>s</i>)	↓	-2.23	± 1.01	3.10E-04	
UN 16	6.61-6.65 (<i>d</i>)	↓	-2.48	± 1.06	6.94E-04	
UN 17	6.95-7.01 (<i>br</i>)	↓	-3.32	± 1.22	5.76E-05	
UN 18	7.07-7.09 (<i>dd</i>)	↓	-2.06	± 0.983	1.22E-06	
UN 19	7.12-7.14 (<i>d</i>)	↓	-1.84	± 0.949	2.45E-06	
UN 20	7.14-7.19 (<i>m</i>)	↓	-2.94	± 1.14	1.22E-06	
UN 21	7.19-7.22 (<i>br</i>)	↓	-2.26	± 1.02	1.19E-04	
UN 22	7.32-7.35 (<i>br</i>)	↓	-1.71	± 0.930	4.03E-04	
UN 23	7.38-7.41 (<i>br</i>)	↓	-3.30	± 1.22	4.28E-06	
UN 24	7.52-7.55 (<i>d</i>)	↓	-3.04	± 1.16	4.28E-06	
UN 25	7.60-7.63 (<i>d</i>)	↓	-2.51	± 1.06	1.84E-05	
UN 26	7.64-7.66 (<i>br</i>)	↓	-2.68	± 1.09	2.79E-04	
UN 27	9.49-9.50 (<i>dd</i>)	↓	-2.49	± 1.06	2.75E-05	
UN 28	9.76-9.77 (<i>br</i>)	↓	-1.16	± 0.862	2.75E-05	

A análise dos espectros médios dos extratos aquosos dos murganhos não revelou diferenças notórias entre o perfil metabólico de murganhos WTcontrol (sem injeção de óleo) e WToil (com injeção de óleo) (Figura 3.32). No entanto, foi visível um aumento da intensidade da grande maior parte dos sinais no espectro dos murganhos WToil. A campo alto e baixo do espectro, verificou-se um aumento ligeiro dos sinais de treonina (1.33 ppm), lactato (1.34 ppm), alanina (1.48 ppm), prolina (2.07 ppm), glutamina (2.13 ppm), formato (8.43 ppm) e AMP (8.61 ppm). Por outro lado, na região 3.00-4.00 ppm, verificou-se um grande aumento na intensidade dos sinais pertencentes à creatina (3.04 ppm e 3.93 ppm), creatina fosfato (3.05 ppm), taurina (3.27 ppm e 3.42 ppm) e glicina (3.56 ppm).

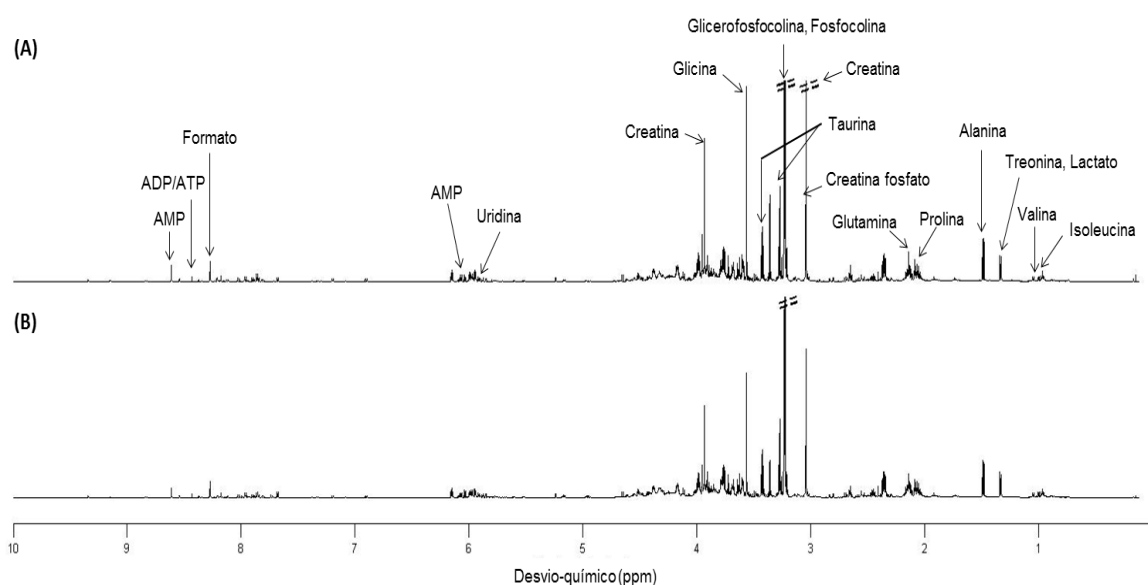


Figura 3.32 - Espectro de RMN de ^1H médio de extratos aquosos de pâncreas de murganhos WTcontrol (A) e WToil (B).

Quando aplicada a análise MVA, o aspeto mais evidente em ambas as análises PCA e PLS-DA foi a presença de 4 amostras de murganhos WToil como possíveis *outliers* (Figura 3.33). Apesar da presença destes *outliers*, viu-se a separação entre murganhos WTcontrol e WToil, pelo que na análise PCA esta era menos evidente e ocorreu ao longo de PC2, ao passo que na análise PLS-DA era mais notória e ocorreu em LV1 ($Q^2=0.889$). Esta separação entre os diferentes grupos refletiu o facto da presença do óleo promover alterações no metabolismo pancreático de compostos polares, o que é surpreendente. Assim, julga-se que este efeito resultou ou da administração da injeção (induzindo *stress* nos animais, por exemplo) ou da influência (indireta) das variações observadas no metabolismo lipídico (descritas anteriormente).

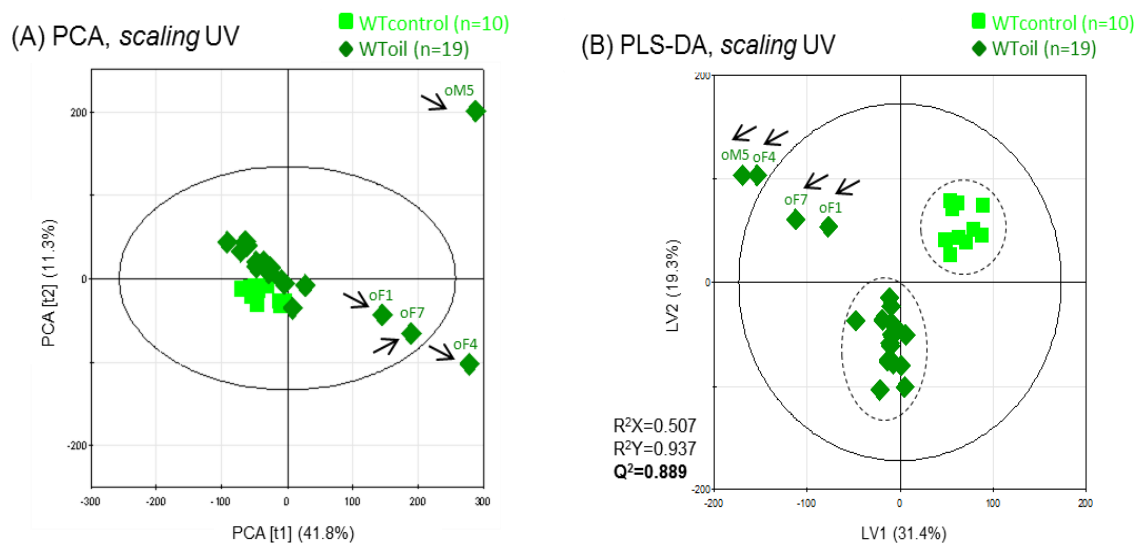


Figura 3.33 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA de espectros de extratos aquosos de murganhos WTcontrol e murganhos WToil.

De forma a compreender o porquê das amostras WToil serem destacadas como possíveis *outliers*, analisaram-se os seus espectros e verificou-se que, na região 0.50-2.00 ppm, existiam sinais mais largos e diferentes dos das restantes amostras (Figura 3.34). Estes extratos aquosos foram contaminados com a fase apolar durante o processo experimental de extração, pelo que as respetivas amostras foram excluídas de análises posteriores.

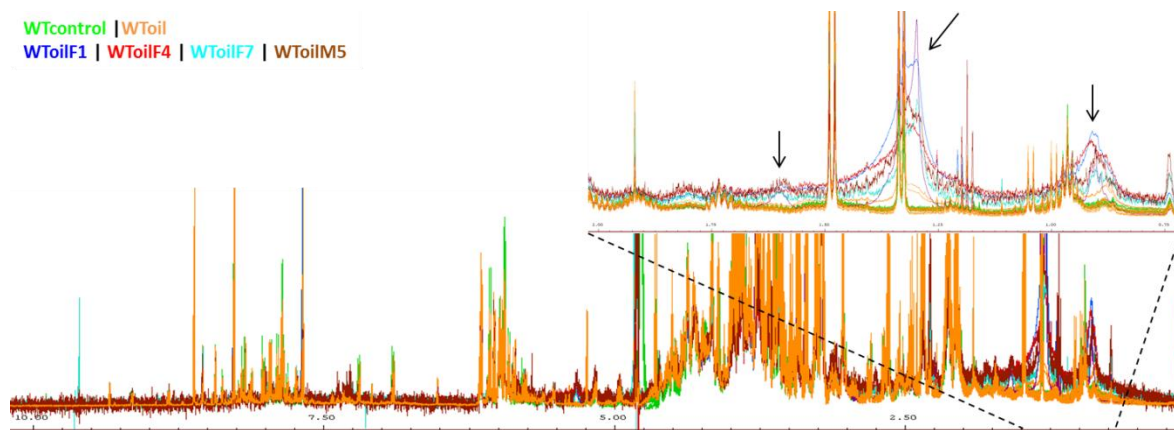


Figura 3.34 – Comparação do perfil espectral das amostras WToil *outliers* (oF1, oF4, oF7 e oM5) com as restantes amostras, pertencentes ao grupo WTcontrol e WToil (extratos aquosos de pâncreas).

A análise PLS-DA repetiu-se, sem as amostras *outliers*, (Figura 3.35, A). A separação ao longo de LV1, entre as duas classes de murganhos, tornou-se mais evidente ($Q^2=0.907$). A análise da projeção do gráfico de *loadings* de LV1 (Figura 3.35, B) revelou que o grupo de murganhos WToil apresentou um aumento dos sinais de treonina, prolina,

glutamina, succinato, GPC, a região 4.20-4.70 ppm, uracilo, UDP ou UTP e adenina. Por outro lado, este grupo apresentou uma diminuição dos sinais de creatina, creatina fosfato, fosfocolina, glicina, glucose, fenilalanina, lactato, região 5.80-6.15 ppm, uridina e AMP.

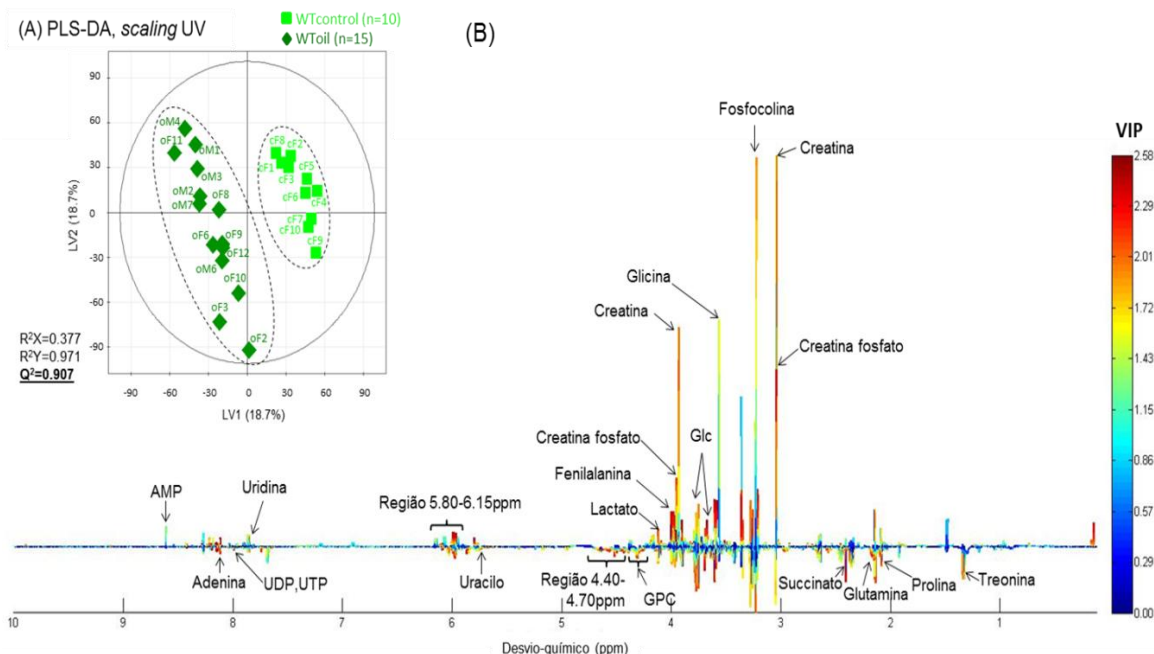


Figura 3.35 – (A) Gráficos de *scores* de PLS-DA de espectros de extratos aquosos de murganços WTcontrol e murganços WToil, após exclusão das amostras *outliers*. (B) Representação dos *loadings* de LV1 resultantes da análise PLS-DA.

A UVA permitiu concluir que o perfil metabólico dos murganços WToil se caracteriza por: a) aumento de adenina, GPC, glucose, glutamina, succinato, UDP ou UTP e uracilo e b) diminuição adenosina, ADP ou ATP, AMP, colina, creatina, creatina fosfato, fosfocolina, glicina, GSH e hipoxantina. Salientam-se, ainda, os sinais e regiões sem identificação atribuída que reforçam a ideia do forte efeito do óleo no metabolismo dos murganços WT.

Para terminar, concluiu-se que a injeção com óleo produziu um efeito considerável no metabolismo basal dos murganços WT, sendo que este era mais esperado no caso de metabolitos apolares do que no caso de metabolitos polares. Assim, de forma a evitar a possível interferência do óleo na interpretação dos resultados, os dados dos restantes extratos lipídicos serão agrupados em 3 matrizes diferentes e a análise será aplicada a cada matriz de forma independente (recordar Capítulo 2.4, página 41). No entanto, esta estratégia levará a que a informação de sinais sobrepostos entre amostras e óleo seja

perdida. De qualquer das formas, nos grupos de murganhos MYC e MYCRAS, o óleo não será um fator muito problemático, pois é uma variável comum aos grupos de murganhos em estudo.

Tabela 3.10 - Metabolitos significativamente alterados (p -value <0.05, ES > ES erro) no metabolismo de murganhos WT C57BL/6; UN-unknown; *s*: singuleto, *d*:dupleteo, *dd*: duplo-dupleteo, *t*:tripleto, *m*:multipleto.

Identificação do metabolito		WToil (n=15) vs. WTcontrol (n=10)				<i>p-value</i>
Nome	δ/ppm (multiplicidade)	ES	±	ES error		
Adenina	8.12 (<i>s</i>)	↑	2.43	± 0.989	4.01E-05	
Adenosina	8.24 (<i>s</i>)	↓	-1.30	± 0.836	5.50E-03	
ADP ou ATP	8.28-8.29 (<i>s</i>)	↓	-1.54	± 0.862	3.56E-03	
AMP	8.60-8.62 (<i>s</i>)	↓	-0.902	± 0.800	3.52E-02	
Colina	3.21 (<i>s</i>)	↓	-2.08	± 0.934	7.19E-05	
Creatina	3.03 (<i>s</i>)	↓	-1.83	± 0.899	1.27E-04	
Creatina fosfato	3.05 (<i>s</i>)	↓	-1.53	± 0.861	6.26E-04	
Fosfocolina	3.22 (<i>s</i>)	↓	-1.07	± 0.814	1.22E-02	
GPC	4.33 (<i>m</i>)	↑	0.929	± 0.802	3.89E-02	
Glicina	3.56 (<i>s</i>)	↓	-1.19	± 0.825	7.26E-03	
Glucose	4.65 (<i>d</i>)	↑	1.21	± 0.827	1.42E-03	
Glutamina	2.45 (<i>m</i>)	↑	1.14	± 0.860	1.37E-02	
GSH	4.17 (<i>m</i>)	↓	-1.04	± 0.811	1.80E-02	
Hipoxantina	8.21 (<i>s</i>)	↓	-4.88	± 1.47	1.44E-05	
Succinato	2.41 (<i>s</i>)	↑	2.52	± 1.06	4.28E-06	
UDP ou UTP	7.98-7.99 (<i>m</i>)	↑	1.56	± 0.865	3.15E-04	
Uracilo	5.78 (<i>d</i>)	↑	1.81	± 0.896	5.31E-04	
Região 1	5.15-5.21	↑	1.47	± 0.854	6.84E-04	
UN 1	4.93-4.98 (<i>m</i>)	↑	1.43	± 0.850	1.21E-03	
UN 2	5.39-5.40 (<i>d</i>)	↑	1.59	± 0.868	2.42E-05	
UN 3	5.60-5.62 (<i>dd</i>)	↑	1.43	± 0.850	1.37E-03	
UN 4	5.67-5.74 (<i>m</i>)	↑	1.29	± 0.834	1.12E-03	
UN 5	5.75-5.76 (<i>s</i>)	↑	2.47	± 1.00	4.49E-06	
UN 6	5.84-5.86 (<i>d</i>)	↑	1.88	± 0.906	3.14E-04	
UN 7	5.86-5.87 (<i>t</i>)	↑	3.49	± 1.18	3.99E-07	
UN 8	6.02-6.03 (<i>s</i>)	↑	2.11	± 0.938	2.64E-04	
UN 9	7.64-7.66 (<i>d</i>)	↑	1.62	± 0.872	3.75E-04	
UN 10	7.67-7.69 (<i>d</i>)	↑	1.86	± 0.903	5.93E-05	
UN 11	7.738-7.742 (<i>t</i>)	↑	2.49	± 1.00	4.88E-05	

Efeito de tamoxifen no metabolismo

Para verificar o possível efeito do tamoxifen no metabolismo dos murganhos WT apresentam-se e discutem-se, primeiro, os resultados dos extratos lipídicos e, posteriormente, dos extratos aquosos. Em relação aos extratos lipídicos, a comparação visual do espectro médio dos murganhos WToil com o espectro médio dos murganhos WTtam demonstrou que o perfil lipídico de ambos os grupos era semelhante, mas registaram-se diferenças de intensidade em vários sinais (Figura 3.36). Deste modo, o efeito do tamoxifen nos murganhos WT produziu uma diminuição dos sinais de colesterol livre ou esterificado (\approx região 0.66-1.05 ppm) e fosfatidilcolina (3.31 ppm) e um aumento de todos os sinais visíveis dos ácidos gordos (região 0.90-2.50 ppm e 5.30-5.40 ppm) e dos triacilglicerídeos (\approx região 4.00-5.00 ppm).

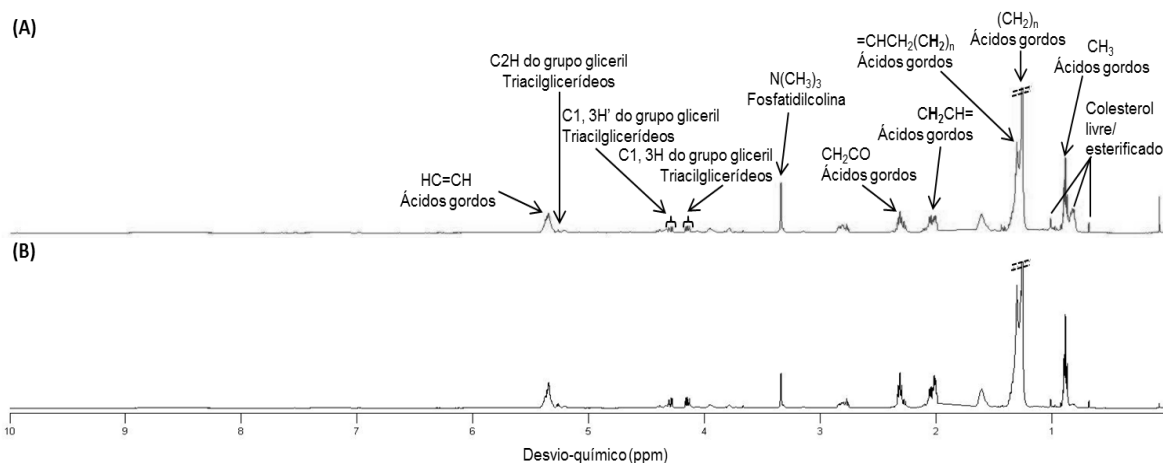


Figura 3.36 - Espectro de RMN de ^1H médio de extratos lipídicos de pâncreas de murganhos WToil (ausência de TAM) (A) e murganhos WTtam (presença de TAM) (B).

As análises PCA e PLS-DA (Figura 3.37) não demonstraram uma separação evidente entre as classes de murganhos, o que se refletiu na baixa robustez do modelo associado à última análise ($Q^2=0.100$). Um dos aspetos notórios foi a presença de dois possíveis *outliers* pertencentes ao grupo WToil (oM5 e oF10), contudo, como não mostraram diferenças espectrais óbvias, não foram excluídas de análises seguintes.

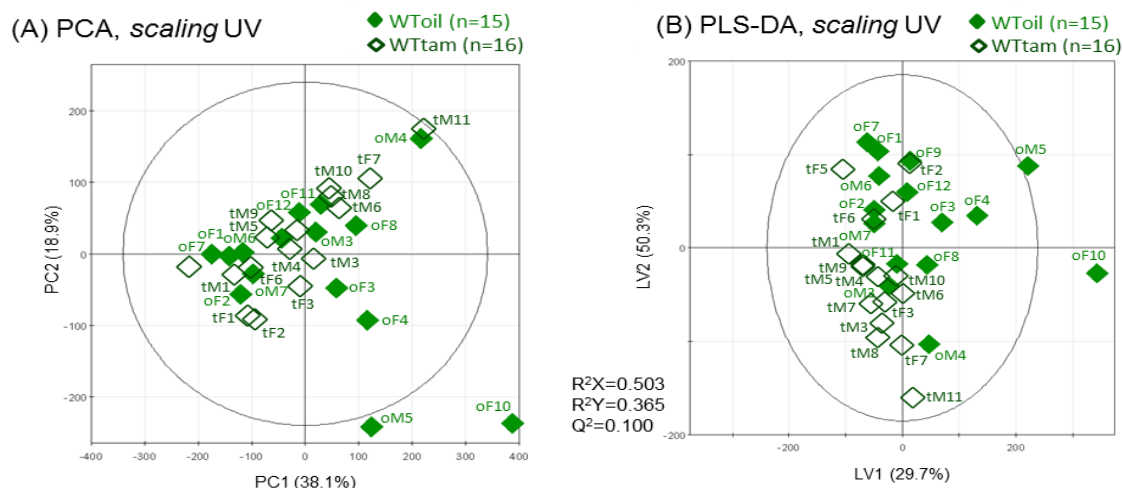


Figura 3.37 - Gráficos de *scores* de PCA (A) e PLS-DA (B) de espectros de extratos lipídicos (Matriz 1, toda a janela espectral) de murganhos WToil e murganhos WTtam.

A seleção de variáveis foi aplicada aos dados numa tentativa de que a separação amostral fosse evidenciada, sendo que 30.35% dos dados originais foram selecionados. Em ambas as análises, PCA e PLS-DA, continuou a existir uma elevada sobreposição entre os dois grupos de murganhos (Figura 3.37), o que se refletiu na baixa robustez ($Q^2=0.231$) do modelo da análise PLS-DA.

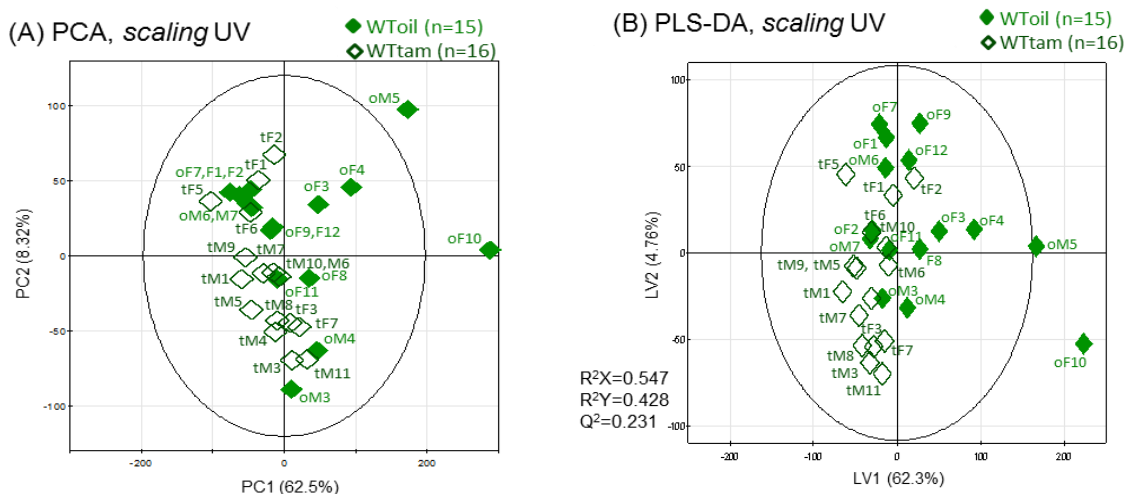


Figura 3.37 – Gráficos de *scores* de PCA (A) e PLS-DA (B), com seleção de variáveis de espectros de extratos lipídicos (Matriz 1) de murganhos WToil e murganhos WTtam.

Apesar da baixa robustez do modelo de PLS-DA, procedeu-se à análise do gráfico da projeção dos *loadings* em LV2 (Figura 3.38). Neste sentido, verificou-se que todos os sinais apresentaram um baixo valor de VIP. O metabolismo dos murganhos WTtam distinguiu-se pelo aumento de colesterol esterificado ou livre e pela diminuição de ácidos

gordos (sinais destacados a campo alto do espectro), fosfatidilcolina (grupo trimetilamina) e triacilglicerídeos (C1, 3H' do grupo gliceril). Esta observação mostra que o tamoxifen provocou um reduzido impacto no metabolismo basal de murganhos WT.

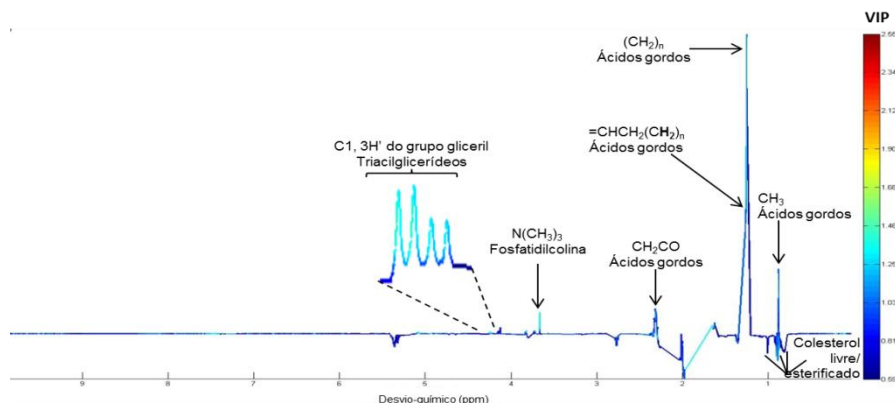


Figura 3.38 – Representação dos *loadings* de LV2 resultantes da análise PLS-DA, com seleção de variáveis, de espectros de extratos lipídicos (Matriz 1) de murganhos WToil e murganhos WTtam.

A análise MVA aplicou-se à Matriz 2, a qual reuniu regiões espectrais sem sobreposição com o óleo, de modo a evidenciar alterações metabólicas que não resultassem da interferência dos sinais do óleo. No entanto, continuou a não existir separação entre classes de murganhos na análise PCA e PLS-DA ($Q^2 = 0.112$) (Figura 3.39).

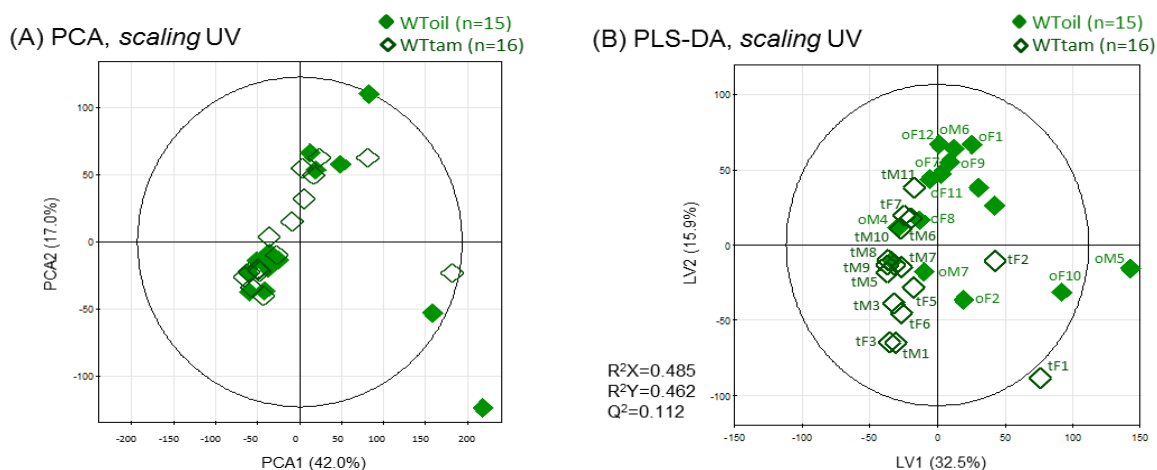


Figura 3.39 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA da Matriz 2 (regiões espectrais sem sobreposição com o espectro do óleo) de espectros de extratos lipídicos de murganhos WToil e murganhos WTtam.

A seleção de variáveis, na qual 23.98% dos dados originais foram selecionados, não melhorou significativamente a separação entre os dois grupos de murganhos, na análise

(A) PCA, scaling UV

WToil (n=15)
WTtam (n=16)

PC1 (47.7%)

PC2 (15.9%)

(B) PLS-DA, scaling UV

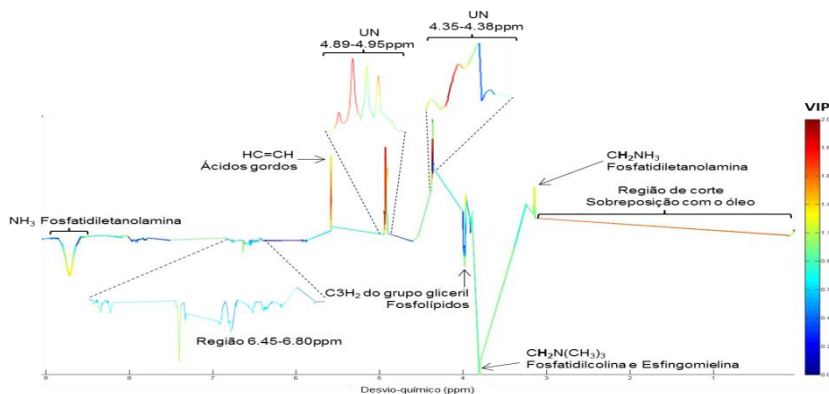
WToil (n=15)
WTtam (n=16)

LV1 (32.8%)

LV2 (27.8%)

$R^2X=0.606$
 $R^2Y=0.444$
 $Q^2=0.290$

Apesar destes resultados, a projeção dos *loadings* de LV1 e a sua análise revelou alguns sinais com $VIP > 1$ para a tendência de separação amostral observada (Figura 3.41). Os metabolitos mais relevantes foram os que se encontravam diminuídos nos murganhos WTam, como a fosfatidiletanolamina (grupo etanolamina), os ácidos gordos (insaturação) e dois sinais não identificados na região dos 4.35-4.38 ppm e 4.89-4.95 ppm. Desta forma, confirmou-se que o tamoxifen não produziu um forte impacto no metabolismo lipídico destes animais. Salienta-se que a região dos 0.5-3.0 ppm, aparentemente, surgiu como relevante, no entanto não foi considerada para a posterior UVA, porque representava uma região espectral de sobreposição com o óleo.



90

A análise PLS-DA da Matriz 3, regiões espectrais dos compostos de colina, revelou de novo a sobreposição entre os dois grupos de murganhos, quer sem ou com a seleção de variáveis (13.88% dados selecionados) (Figura 3.42). Consequentemente, a robustez de ambos os modelos, sem e com seleção de variáveis, foi bastante baixa ($Q^2=0.0740$ e $Q^2=0.0767$, respetivamente), mostrando a ausência de efeito do TAM no metabolismo deste tipo de compostos.

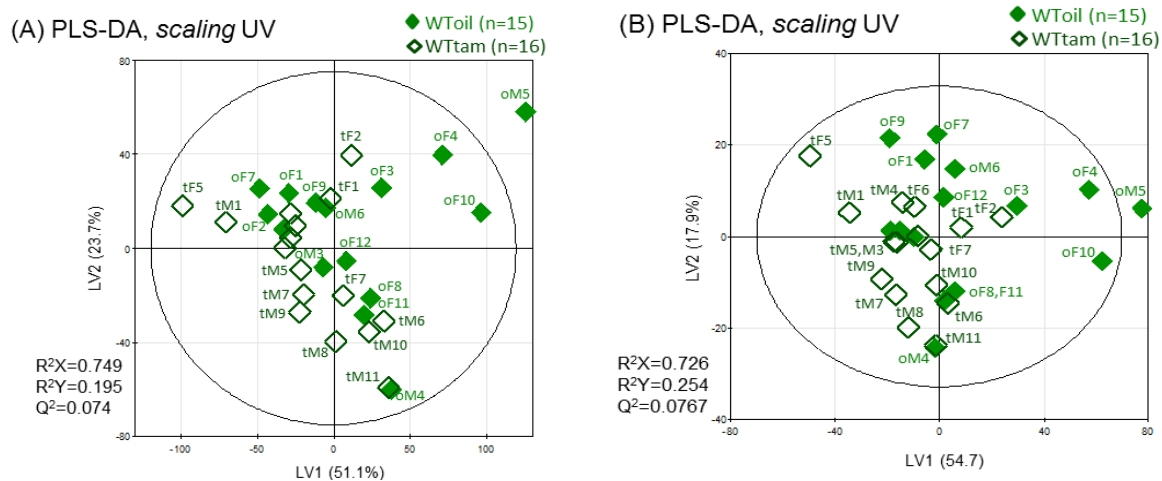


Figura 3.42 - Gráficos de *scores* de PLS-DA, (A) sem e (B) com seleção de variáveis, da Matriz 3 (regiões espectrais da colina e compostos de colina) de espectros de extratos lipídicos de murganhos WToil e murganhos WTtam.

Recordam-se os valores de robustez (Q^2) dos modelos de PLS-DA até aqui apresentados, com o objetivo de se escolher o mais adequado para posterior UVA (Tabela 3.11). Deste modo, o modelo selecionado foi aquele que se obteve quando consideradas as regiões sem sobreposição com o óleo e aplicada a seleção de variáveis aos dados, sendo que a robustez do modelo foi, no entanto, muito baixa ($Q^2=0.290$).

Tabela 3.11 – Robustez dos modelos de PLS-DA da comparação do perfil lipídico entre murganhos WToil e WTtam.

		Robustez (Q^2) dos modelos da análise PLS-DA da comparação dos murganhos WTtam vs. WToil	
		<u>Sem</u> seleção de variáveis	<u>Com</u> seleção de variáveis
Regiões consideradas na construção da matriz	Todo o espectro	0.100	0.231 (30.35% dados originais selecionados)
	Regiões sem sobreposição com o espectro do óleo	0.112	0.290 (23.98% dados originais selecionados)
	Regiões da colina e dos compostos de colina	0.0740	0.0726 (27.72% dados originais selecionados)

A UVA revelou que nenhum dos metabolitos, selecionados a partir dos *loadings* (página 107), era relevante para a distinção do perfil metabólico dos dois grupos de murganhos. Posto isto, confirmou-se que o fármaco tamoxifen não induz alterações no metabolismo lipídico basal de murganhos WT. Assim, assumiu-se que a presença deste fármaco não influenciou diretamente o metabolismo lipídico dos murganhos MYC e MYCRAS, pelo que possíveis variações lipídicas observadas resultaram do efeito da ativação do oncogene MYC.

De modo a verificar se o tamoxifen também não afetou o metabolismo de compostos polares, analisaram-se os extratos aquosos. A comparação visual dos espectros médios dos grupos de murganhos em questão (Figura 3.43) sugeriu que a presença de TAM promoveu o aumento de alguns sinais, por exemplo, os de creatina (3.04 ppm e 3.93 ppm), creatina fosfato (3.05 ppm), taurina (3.27 ppm e 3.42 ppm), glicina (3.56 ppm) e glucose (4.64 ppm e 5.23 ppm). Por outro lado, a presença deste fármaco induziu uma diminuição, apenas, no sinal do formato (8.43 ppm).

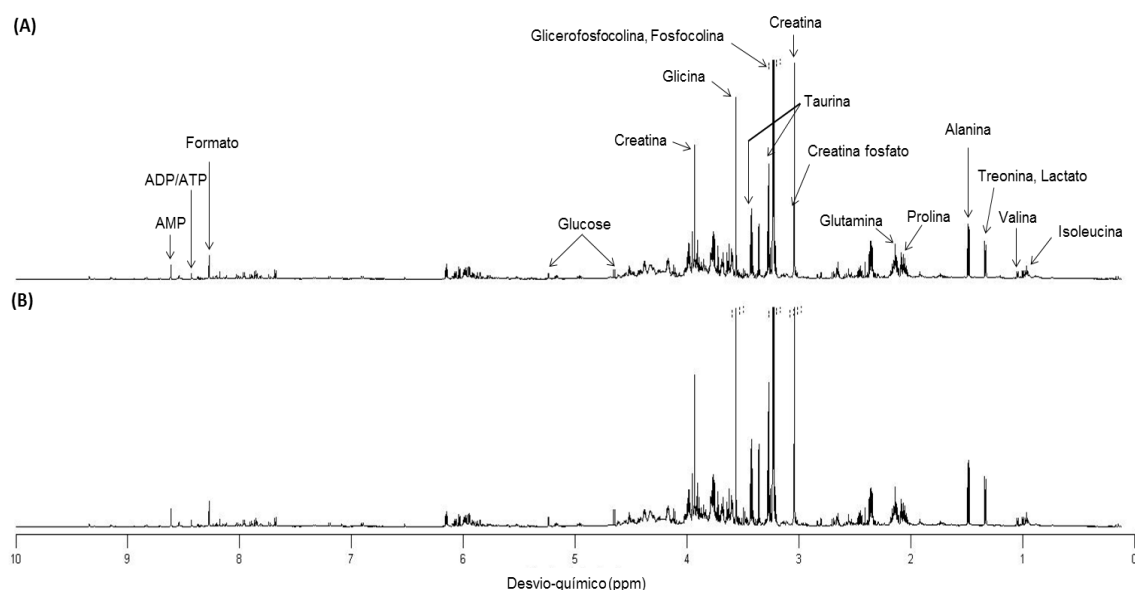


Figura 3.43 - Espectro de RMN de ^1H médio de extratos aquosos de (A) murganhos WT_{oil} e (B) murganhos WT_{tam}.

A análise MVA não revelou nenhuma separação intergrupar, identificando-se várias amostras *outliers* (Figura 3.44). A análise dos seus respetivos espectros mostrou que estes se diferenciavam dos restantes devido à presença de sinais lipídicos, conforme observado no

capítulo anterior. Assim, estas amostras *outliers* foram excluídas e repetiu-se a análise PLS-DA sem e com seleção de variáveis.

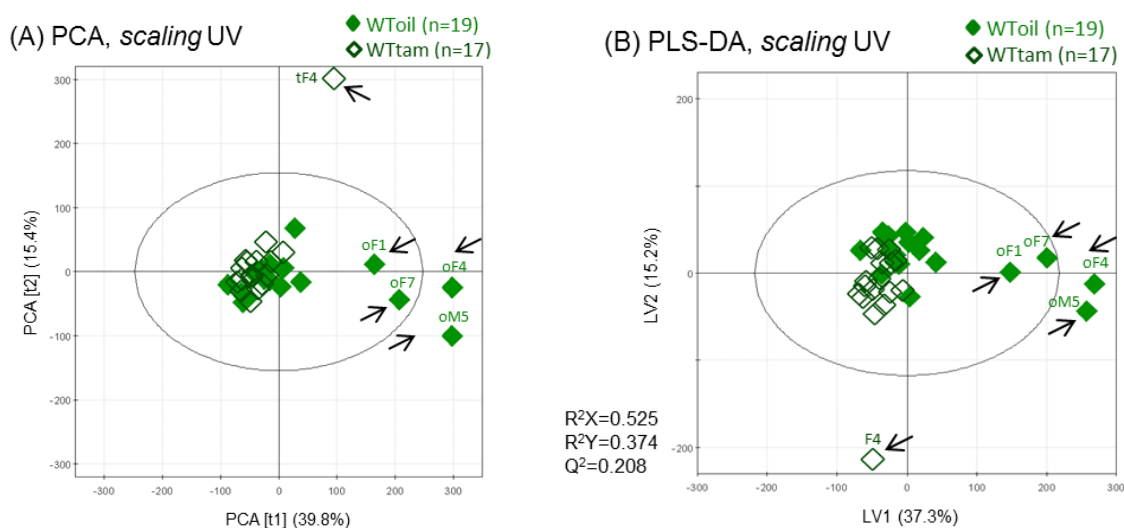
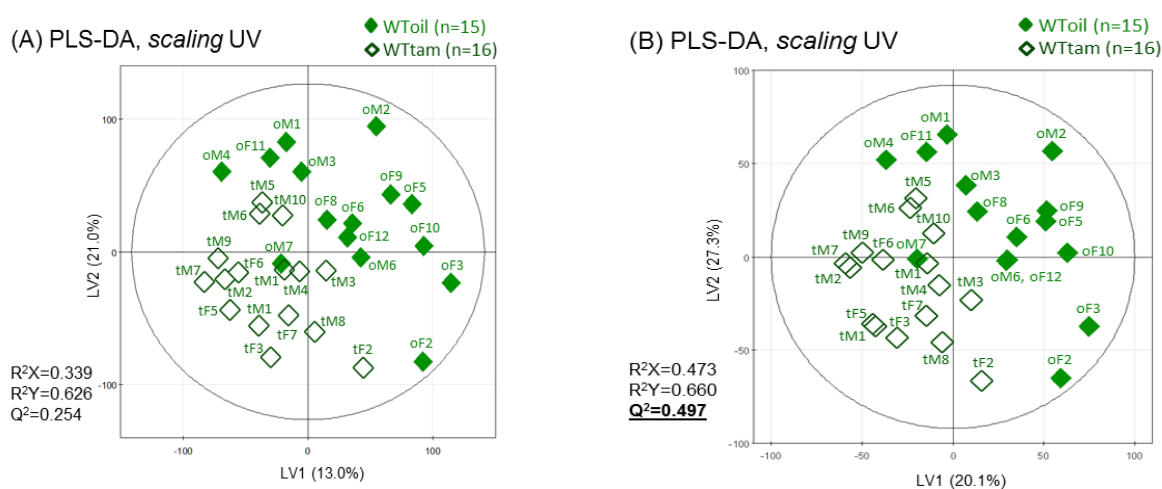


Figura 3.44 – Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA de espectros de extratos aquosos de murganhos WTtoil e murganhos WTtam.

A análise sem seleção de variáveis promoveu uma subtil separação dos grupos em LV1, pelo que a robustez do modelo melhorou ligeiramente, continuando baixa ($Q^2=0.254$) (Figura 3.45, A). Com a seleção de variáveis (32.38% dos dados originais foram seleccionados), o padrão de separação entre grupos manteve-se semelhante e a robustez do modelo aumentou consideravelmente ($Q^2=0.497$) (Figura 3.45, B). Assim, este foi o modelo escolhido para posterior UVA.



A análise do gráfico de *loadings* de LV1 evidenciou vários sinais que distinguiram os distintos grupos de murganhos (Figura 3.46). Assim, o perfil metabólico do grupo WT, após administração de TAM, caracterizou-se pelo aumento dos sinais de treonina ou lactato, alanina, GSH, taurina, glucose (principalmente na região 3.60-3.75 ppm), GPC, lactato, sacarose, ADP ou ATP. Por outro lado, verificou-se a diminuição dos sinais de succinato, colina e fosfocolina, glicina e AMP. Neste sentido, houve a indicação de que o TAM promoveu um certo efeito no metabolismo basal de compostos polares, nos murganhos WT.

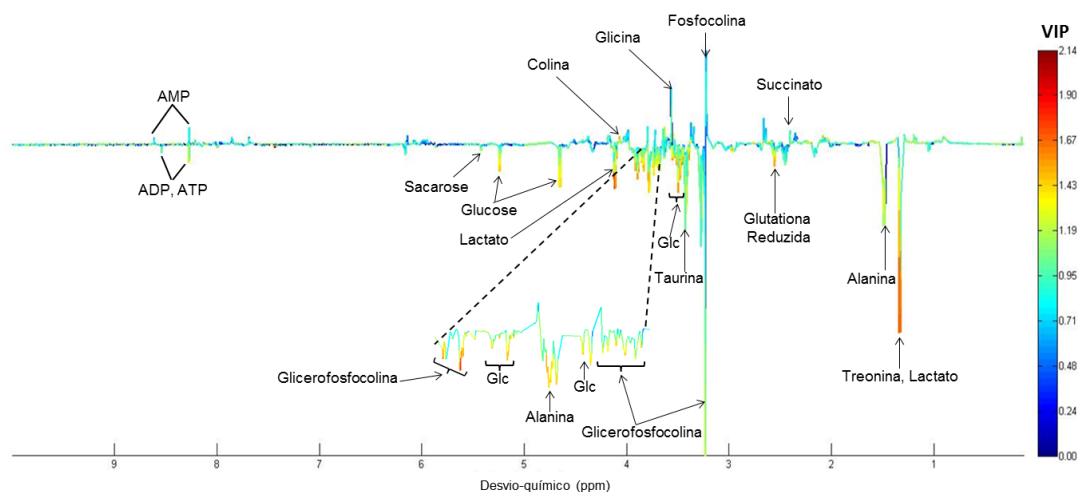


Figura 3.46 – Representação dos *loadings* de LV1 resultantes da análise PLS-DA, com seleção de variáveis e com a exclusão das amostras *outliers*, dos espectros de extratos aquosos de murganhos WToil e murganhos WTtam.

Por último, a UVA permitiu caracterizar o perfil metabólico dos murganhos WTtam pelas seguintes variações: a) aumento de GPC, glucose, lactato e taurina e b) diminuição de colina (Tabela 3.12). O efeito do fármaco tamoxifen no metabolismo dos murganhos WT foi, ainda, evidenciado pelas variações em várias regiões e sinais sem identificação atribuída.

Em suma, concluiu-se que o tamoxifen não induziu uma alteração muito drástica no metabolismo dos murganhos WT, se bem que o efeito deste fármaco foi mais notório em metabolitos polares do que nos apolares. Neste sentido, comprovou-se que a presença do fármaco utilizado na ativação do oncogene MYC em ambos os modelos de murganhos, MYC e MYCRAS, não influenciará o metabolismo basal dos murganhos, de um modo geral.

Tabela 3.12 - Metabolitos significativamente alterados (p -value <0.05, ES > ES erro), devido à injeção da solução de tamoxifen dissolvido em óleo, no metabolismo de murganhos WT C57BL/6; UN: *unknown*; *d*: duplete, *t*: tripleto, *q*: quarteto, *m*: multiplete.

Identificação do metabolito		WTtam (n=16) vs. WToil (n=15)				p -value
Nome	δ / ppm (multiplicidade)		ES	\pm	ES error	
Colina	4.07-4.09 (<i>t</i>)	↓	-0.951	\pm	0.690	1.98E-02
GPC	3.89-3.90 (<i>m</i>)	↑	1.36	\pm	0.725	7.91E-04
Glucose	5.23 (<i>d</i>)	↑	0.869	\pm	0.684	2.12E-02
Lactato	4.10 (<i>q</i>)	↑	0.958	\pm	0.691	5.38E-03
Taurina	3.42 (<i>t</i>)	↑	0.772	\pm	0.678	2.31E-02
Região 1	2.20-2.28	↓	-0.869	\pm	0.737	2.67E-02
Região 2	3.74-3.80	↑	0.933	\pm	0.689	2.99E-02
Região 3	3.80-3.87	↑	0.884	\pm	0.685	1.82E-02
Região 4	4.307-4.425	↓	-0.773	\pm	0.678	4.42E-02
UN 1	1.19 (<i>t</i>)	↓	-0.794	\pm	0.732	3.66E-02

3.3.2. Efeito da ativação do oncogene MYC

De forma a compreender o efeito da ativação do oncogene MYC nas alterações metabólicas que caracterizam o PC comparou-se o perfil metabólico dos dois diferentes grupos de murganhos MYCoil (oncogene MYC *off*) e MYCtam (oncogene MYC *on*). Ao longo desta secção serão abordados os resultados dos extratos lipídicos, primeiro, e dos extratos aquosos, posteriormente. A comparação visual dos espectros médios dos extratos lipídicos dos grupos de murganhos em questão destacou a diferença na intensidade de vários sinais (Figura 3.47). Deste modo, nos murganhos MYCtam foi evidente uma diminuição dos sinais de colesterol livre ou esterificado (região 0.67-1.05 ppm), região 1.40-1.44 ppm e fosfatidilcolina (3.31 ppm) e um aumento na intensidade dos sinais de ácidos gordos (região 0.80-2.40 ppm) e triacilglicerídeos (\approx regiões 4.10-4.30 ppm e 5.20 ppm).

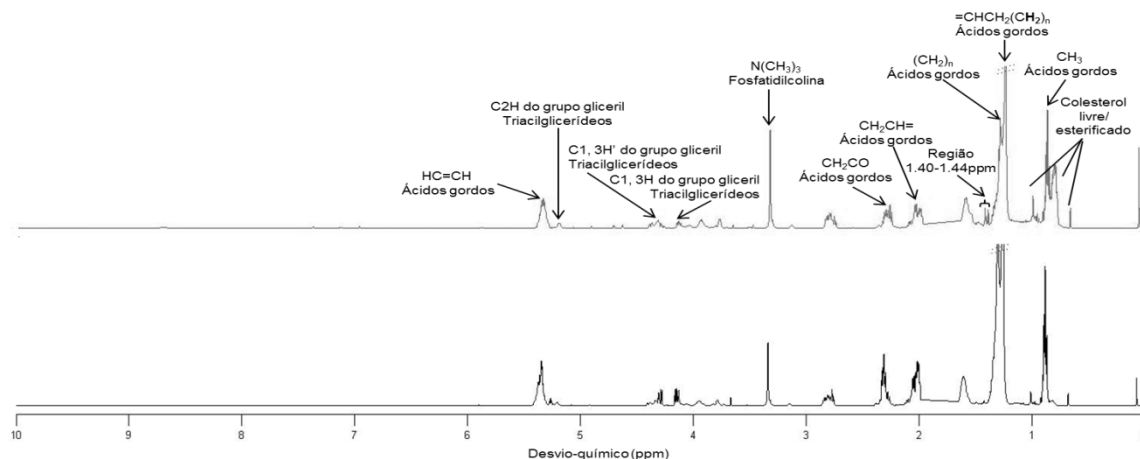


Figura 3.47 - Espectro de RMN de ^1H médio de extratos lipídicos de pâncreas de (A) murgancho MYCoil e (B) murgancho MYCtam.

A análise de PCA não revelou separação relevante entre o grupo de murgancho MYCoil e MYCtam, o que se refletiu na consequente sobreposição entre algumas amostras (Figura 3.48, A). Por outro lado, a análise de PLS-DA já demonstrou alguma separação entre os dois grupos de murgancho, em LV1, embora que fraca ($Q^2=0.299$) (Figura 3.48, B).

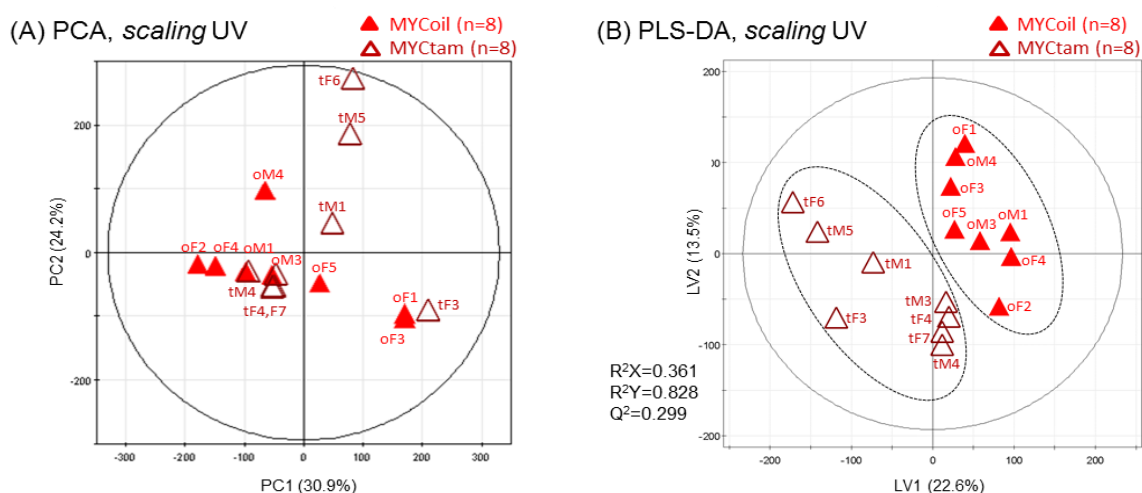


Figura 3.48 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA de espectros de extratos lipídicos (Matriz 1) de murgancho MYCoil e murgancho MYCtam.

A análise de PLS-DA repetiu-se após seleção de variáveis, sendo que foram selecionados 24.68% dos dados originais (Figura 3.49, A). O padrão de separação entre os grupos de murgancho manteve-se em LV1, agora com uma maior robustez ($Q^2=0.604$). A análise do gráfico de *loadings* de LV1 destacou, apenas, a cadeia carbonada dos ácidos

gordos e o grupo gliceril dos triacilglicerídeos como principais responsáveis por esta separação (Figura 3.49, B).

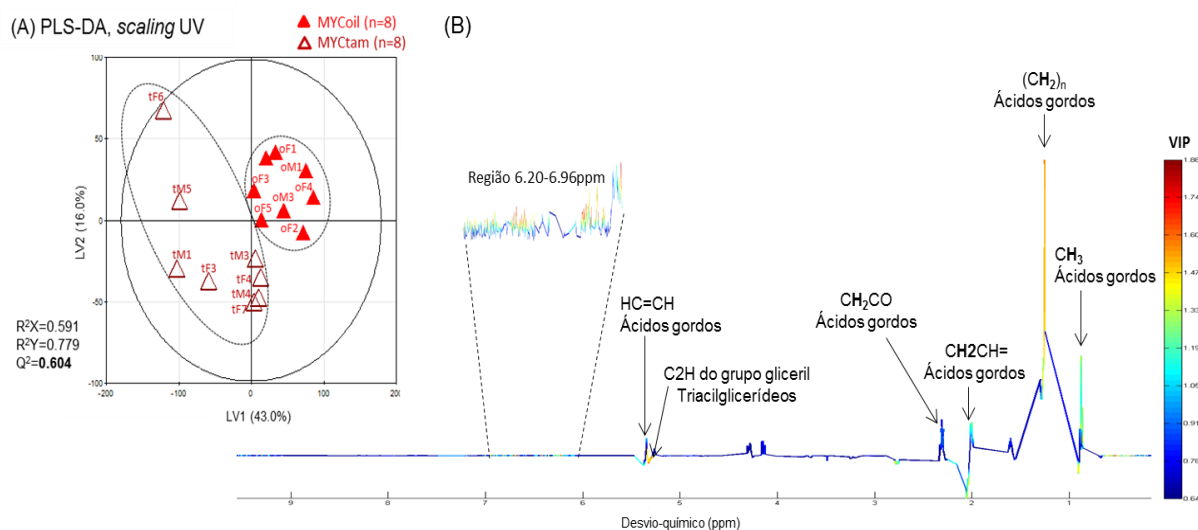


Figura 3.49 - (A) Gráficos de *scores* de PLS-DA, com seleção de variáveis, dos espectros de extratos lipídicos (Matriz 1) de murganhos MYCoil e murganhos MYCtam. (B) Representação dos *loadings* de LV1 resultantes da análise PLS-DA.

A análise MVA repetiu-se para a Matriz 2, mas ambas as análises de PCA e PLS-DA (Figura 3.50, A e B, respetivamente) resultaram na total ausência de separação entre os grupos de murganhos ($Q^2 = -0.167$). Deste modo, a baixa robustez do modelo associado à análise PLS-DA reflete a similaridade das regiões espectrais analisadas entre grupos. Deste modo, não se procedeu à análise da projeção dos *loadings*.

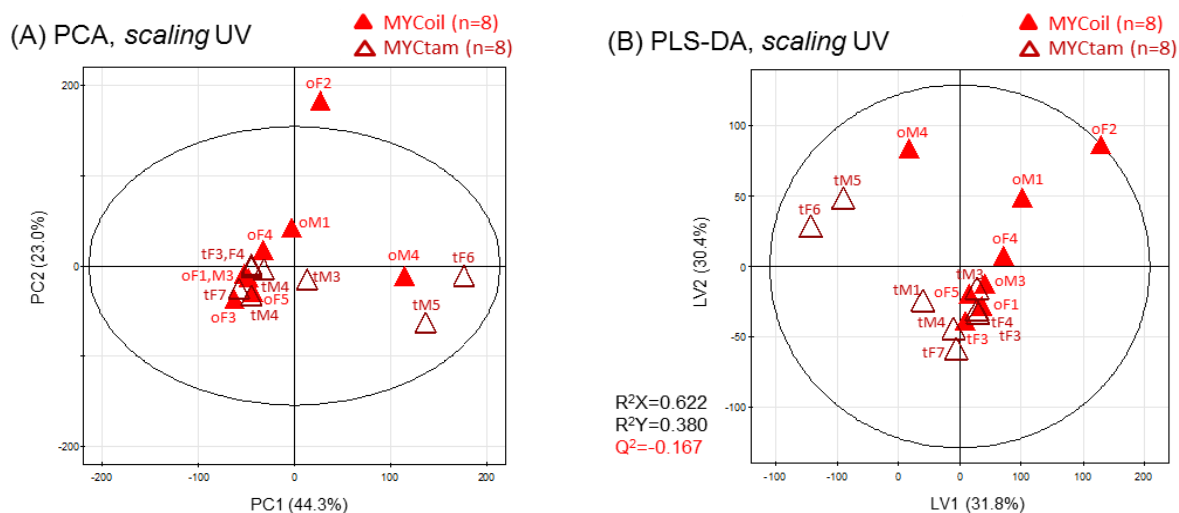


Figura 3.50 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA da Matriz 2 (regiões espectrais sem sobreposição com o espectro do óleo) de espectros de extratos lipídicos de murganhos MYCoil e murganhos MYCtam.

Aplicando-se a seleção de variáveis (seleção de 25.98% dos dados originais), observou-se uma elevada sobreposição na análise de PCA entre os diferentes grupos de murganhos (Figura 3.51, A). Por outro lado, na análise de PLS-DA (Figura 3.51, B) verificou-se uma tendência de distribuição amostral dos murganhos MYCoil em valores positivos de LV2 e dos murganhos MYCtam em valores negativos de LV2, mas sem robustez significativa ($Q^2 = 0.139$). Salienta-se que a amostra pertencente ao grupo MYCoil (oF2) não foi considerada outlier, sendo considerada nas análises seguintes, visto que o seu espectro apresentou um perfil semelhante ao das restantes amostras do grupo.

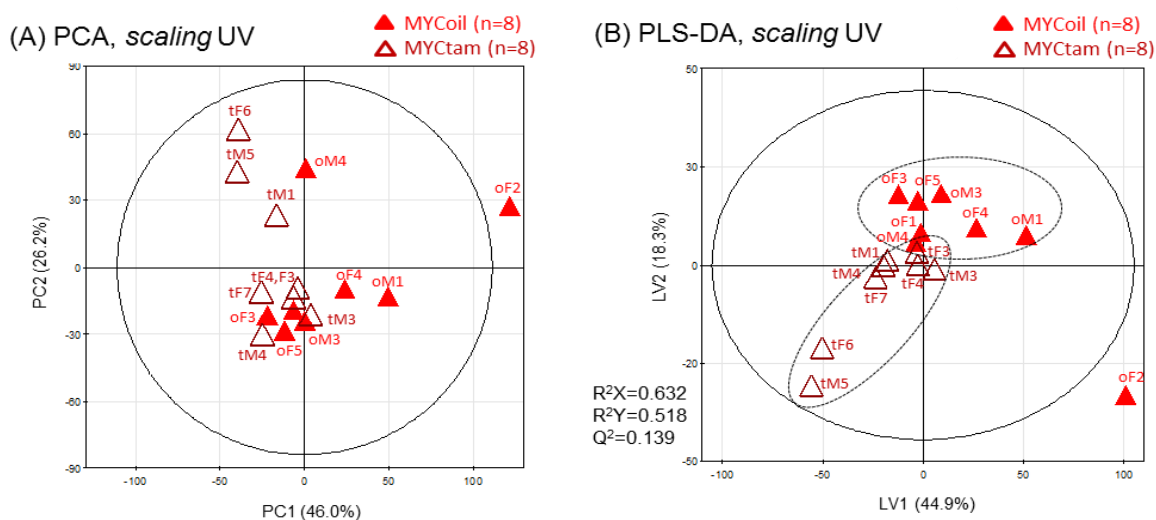


Figura 3.51 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA, com seleção de variáveis, da Matriz 2 de espectros de extratos lipídicos de murganhos MYCoil e murganhos MYCtam.

Apesar da baixa robustez da análise PLS-DA ($Q^2 = 0.139$), com seleção de variáveis, procedeu-se à projeção dos *loadings* em LV2 (Figura 3.52), dada a importância da comparação entre estes dois grupos de murganhos. Os sinais destacados no gráfico de *loadings* apresentaram baixos valores de VIP, sendo que aqueles aumentados no grupo MYCtam pertenciam à cadeia carbonada dos ácidos gordos insaturados (20:4) e à região 6.35-6.85 ppm, ao passo que, os diminuídos perteciam à classe de fosfolípidos (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomiéline) e, ainda, à região 7.52-7.55 ppm.

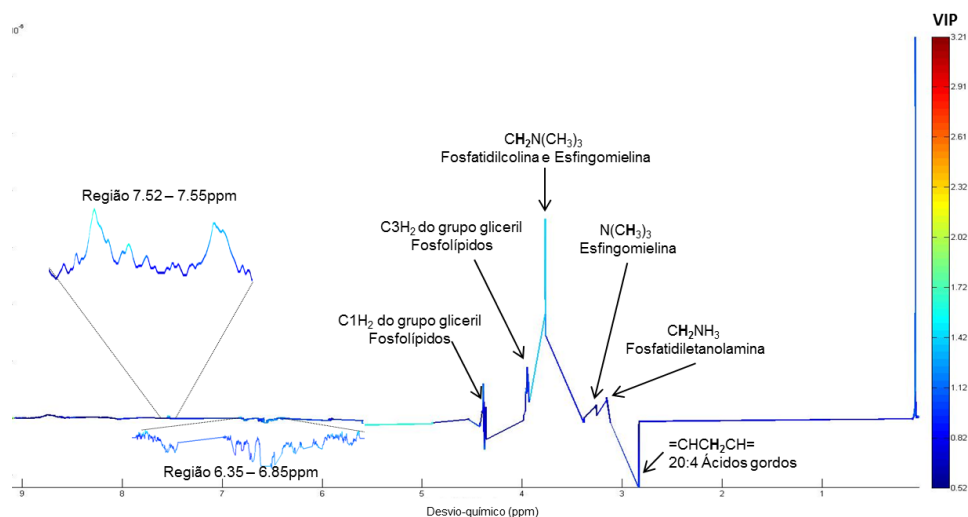


Figura 3.52 – Representação dos *loadings* de LV2 resultantes da análise PLS-DA, com seleção de variáveis, da Matriz 2 dos espectros de extratos lipídicos de murganhos MYCoil e murganhos MYCtam.

A análise PLS-DA da matriz referente à colina e aos seus compostos derivados, realizou-se sem e com seleção de variáveis, sendo que neste último caso foram selecionados, apenas, 8.58% dos dados originais (Figura 3.53). Ambas as análises PLS-DA revelaram uma sobreposição amostral e, conseqüentemente, a robustez de ambos os modelos foi muito baixa ($Q^2 = -0.210$ e $Q^2 = -0.084$, respetivamente), o que sugereu que a ativação do oncogene MYC não teve impacto metabólico nos compostos de colina.

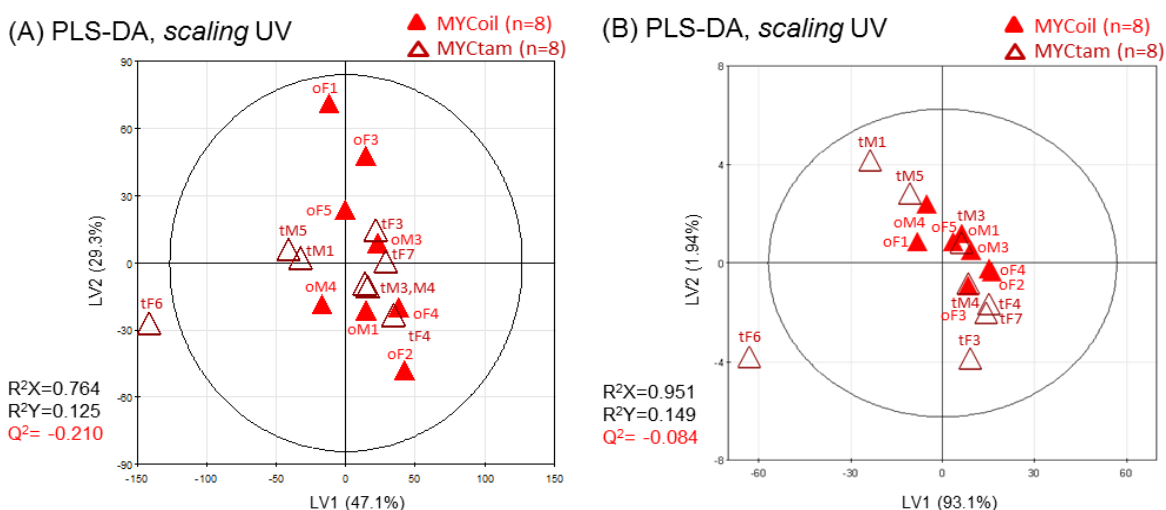


Figura 3.53 - Gráficos de *scores* de PLS-DA, (A) sem e (B) com seleção de variáveis, da Matriz 3 (regiões espectrais da colina e compostos de colina) de espectros de extratos lipídicos de murganhos MYCoil e MYCtam.

De forma a escolher o melhor modelo PLS-DA da análise aplicada às 3 matrizes diferentes dos extratos lipídicos recordam-se os seus valores de robustez (Q^2) (Tabela 3.14). O melhor modelo obteve-se quando foi considerado todo o espectro e se aplicou a seleção de variáveis aos dados, sendo que a robustez do modelo foi boa ($Q^2=0.604$) (se necessário, recordar Figura 3.49, página 97). Assim, este foi o modelo selecionado para posterior UVA.

Tabela 3.14 - Robustez dos modelos estatísticos resultantes da análise PLS-DA da comparação do perfil lipídico entre murganhos MYCoil e MYCtam.

		Robustez (Q^2) dos modelos da análise PLS-DA da comparação dos murganhos MYCtam vs. MYCoil	
		Sem seleção de variáveis	Com seleção de variáveis
Regiões consideradas na construção da matriz	Todo o espectro	0.299	0.604 (24.68% dados originais selecionados)
	Regiões sem sobreposição com o espectro do óleo	- 0.167	0.139 (25.98% dados originais selecionados)
	Regiões da colina e dos compostos de colina	- 0.210	- 0.084 (8.58% dados originais selecionados)

Com a UVA verificou-se que a ativação do oncogene MYC não se manifestou através de grandes alterações no metabolismo lipídico dos murganhos. Assim, o perfil lipídico dos murganhos MYCtam caracterizou-se pelo aumento de colesterol livre ou esterificado e ressonância não identificada (região 0.53-0.54 ppm) e pela diminuição do comprimento da cadeia carbonada dos ácidos gordos.

Tabela 3.15 - Metabolitos significativamente alterados (p -value <0.05, ES > ES erro), devido à ativação do oncogene MYC no metabolismo lipídico de murganhos MYC; UN: *unknown*; *s*: singuleto, *br*: largo

Identificação do metabolito		MYCtam (n=8) vs. MYCoil (n=8)				p -value
Nome	δ /ppm (multiplicidade)	ES	\pm	ES erro		
(CH ₂) _n Ácidos gordos	1.26 (<i>br</i>)	↓	-1.80	\pm	1.16	6.99E-03
Colesterol livre ou esterificado	0.68 (<i>s</i>)	↑	1.83	\pm	1.17	2.95E-03
UN 1	0.53-0.54 (<i>s</i>)	↑	2.23	\pm	1.25	1.86E-03

A comparação visual dos espectros médios dos extratos aquosos do grupo de murganhos em questão não revelou diferenças notórias em termos de perfil espectral (Figura 3.54). Salientam-se, apenas, as diferentes intensidades de alguns sinais: do espectro A

(murganhos MYCoil) para o espectro B (murganhos MYCtam) há uma diminuição de compostos de colina (fosfocolina, 3.22 ppm e GPC, 3.23 ppm) e formato (8.43 ppm) e, por outro lado, um aumento de taurina (3.27 ppm, 3.42 ppm) e de glucose (5.23 ppm).

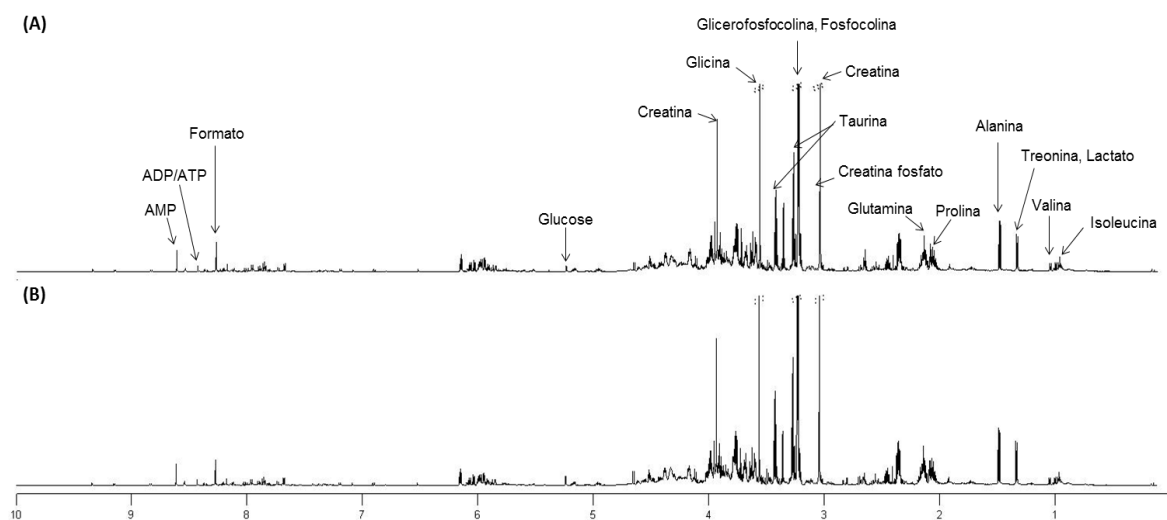


Figura 3.54 - Espectro de RMN de ^1H médio de extratos aquosos de pâncreas de murganhos MYCoil (A) e murganhos MYCtam (B).

Na análise PCA verificou-se uma total sobreposição entre as duas classes de murganhos, devido à presença de dois potenciais *outliers* (oM1 e tM1) (Figura 3.55, A). Na análise PLS-DA, foi possível verificar alguma tendência para o agrupamento de classes ($Q^2=0.365$), em LV1, apesar da presença dos *outliers* (Figura 3.55, B).

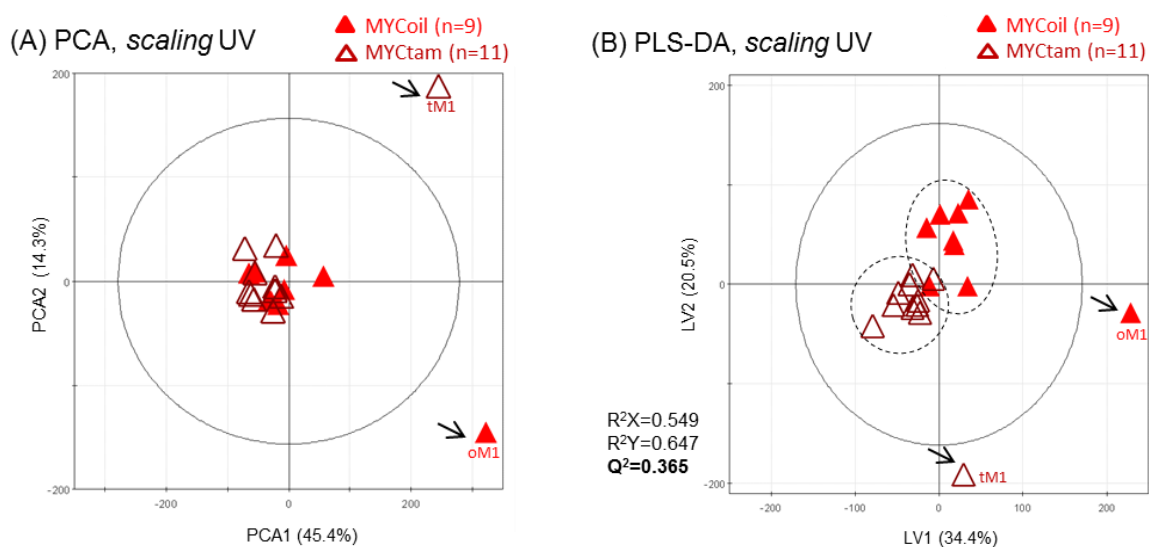


Figura 3.55 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA, sem seleção de variáveis, de espectros de extratos aquosos de murganhos MYCoil e murganhos MYCtam.

As amostras *outliers* foram excluídas, visto que a análise do seu espectro revelou a presença de conteúdo lipídico na região 0.05-2.00 ppm (Figura 3.56). Verificaram-se, ainda, diferenças nestes espectros na região 4.00-4.75 ppm e 6.50-7.50 ppm.

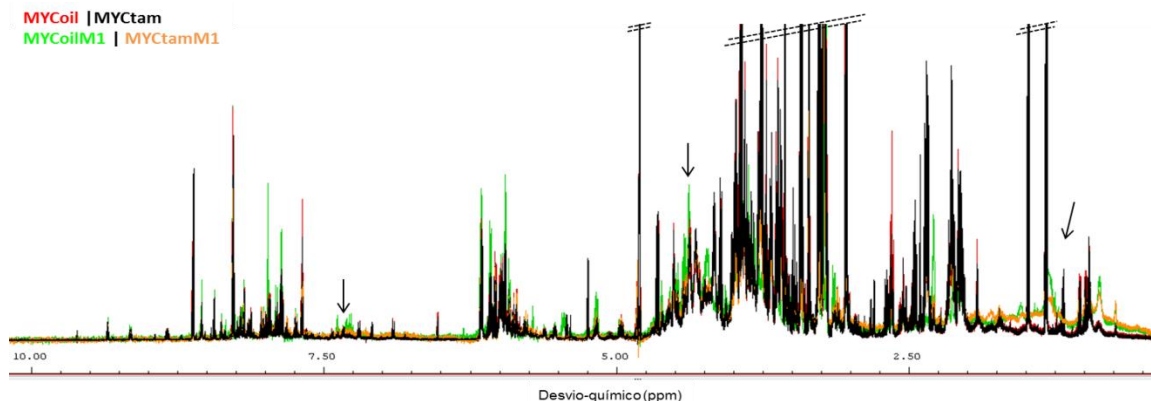


Figura 3.56 - Comparação do perfil espectral das amostras MYCoilM1 e MYCtamM1 com as restantes amostras pertencentes aos grupos em questão (extratos aquosos de pâncreas).

A análise PLS-DA repetiu-se e, desta vez, mostrou uma clara separação entre as duas classes de murganhos, em LV1 ($Q^2=0.584$) (Figura 3.57, A). A seleção de variáveis (32.81% dos dados originais selecionados) resultou num modelo PLS-DA melhorado ($Q^2=0.746$) (Figura 3.57, B). Desta forma, houve a indicação de que a ativação do oncogene MYC teve um impacto evidente no metabolismo de compostos polares dos murganhos. Este último modelo foi o escolhido para a posterior análise de dados.

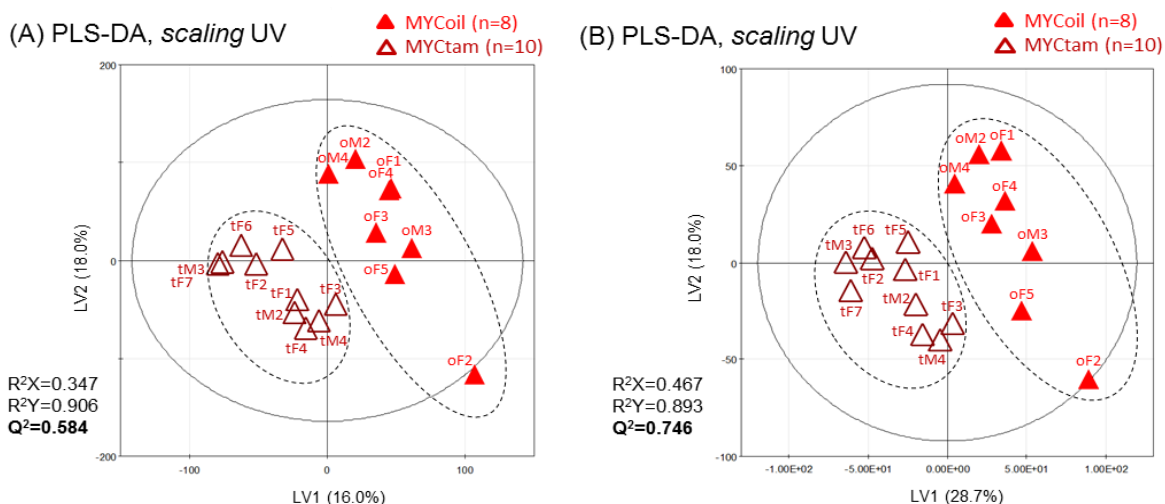


Figura 3.57 - Gráficos de *scores* de PLS-DA, (A) sem e (B) com seleção de variáveis, de espectros de extratos aquosos de murganhos MYCoil e murganhos MYCtam, resultantes da exclusão das amostras *outliers*.

A análise da projeção dos *loadings* de LV1 evidenciou que os metabolitos aumentados no grupo de murganhos MYCtam contribuíram com um maior peso (VIP >1), o que comprovou o impacto da ativação do oncogene MYC no metabolismo destes animais (Figura 3.58). Assim, o perfil metabólico dos murganhos MYCtam definiu-se pelo aumento de compostos de colina, fosfocolina e GPC, alanina e glucose e pela diminuição de taurina e UDP ou UTP.

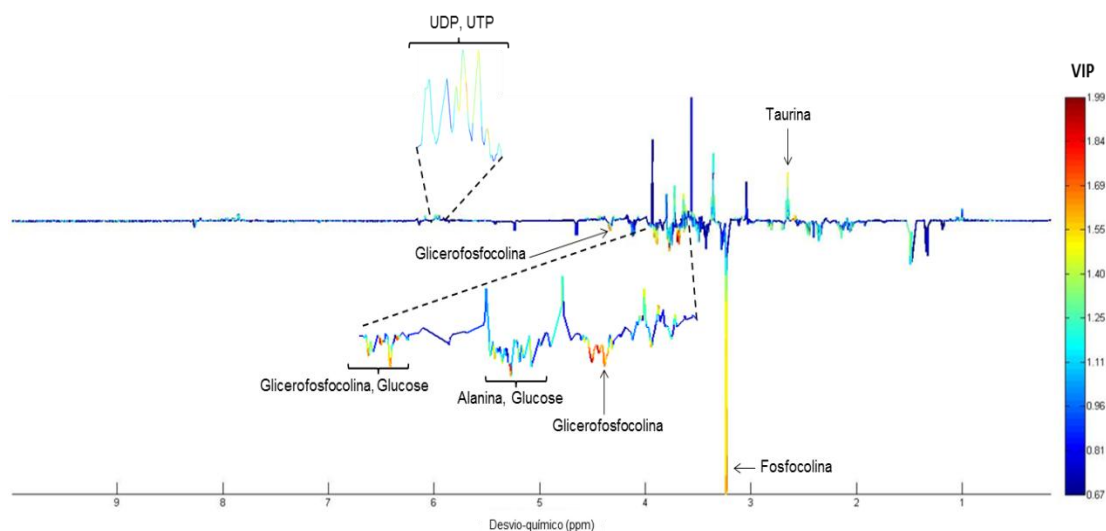


Figura 3.58 - Representação dos *loadings* de LV1 resultantes da análise PLS-DA, com seleção de variáveis e com a exclusão das amostras *outliers*, dos espectros de extratos aquosos de murganhos MYCoil e murganhos MYCtam.

A UVA permitiu caracterizar o perfil metabólico dos murganhos MYCtam por: a) aumento de GPC, glutamato, prolina e succinato e b) diminuição de glutamina, hipotaurina, isoleucina, UDP ou UTP, UDP-GalNAc e uridina (Tabela 3.13). O efeito da ativação do oncogene MYC também se refletiu a nível de algumas regiões espectrais e sinais sem identificação atribuída, ainda.

Tabela 3.13 - Metabolitos significativamente alterados (p -value <0.05, ES > ES erro), devido à ativação dos oncogene MYC, no metabolismo de murganhos MYC; UN: *unknown*; s: singuleto, d: duplete, t: tripleto, m: multiplete.

Identificação do metabolito		MYCtam (n=9) vs. MYCoil (n=8)				<i>p-value</i>
Nome	δ/ppm (multiplicidade)	ES	±	ES error		
GPC	3.91-3.92 (<i>m</i>)	↑	1.11	± 0.946	5.66E-03	
Glutamato	2.09 (<i>m</i>)	↑	1.07	± 0.993	2.94E-02	
Glutamina	3.62 (<i>m</i>)	↓	-1.43	± 0.986	5.66E-03	

Hipotaurina	2.67 (<i>t</i>)	↓	-1.32	±	1.03	2.66E-02
Isoleucina	1.02 (<i>d</i>)	↓	-1.39	±	1.03	2.66E-02
Prolina	2.35 (<i>m</i>)	↑	1.05	±	0.991	4.34E-02
Succinato	2.41(<i>s</i>)	↑	1.22	±	1.01	3.67E-02
UDP ou UTP	6.06-6.07 (<i>m</i>)	↓	-1.43	±	0.986	9.69E-03
UDP-GalNAc	5.51-5.52	↓	-1.39	±	0.981	1.25E-02
Uridina	7.86 (<i>d</i>)	↓	-1.12	±	0.947	3.10E-02
Região 1	3.67-3.70	↑	1.33	±	0.972	4.24E-03
Região 2	7.88-7.91	↓	-1.04	±	0.938	2.51E-02
UN 1	0.726-0.751 (<i>s</i>)	↓	-1.18	±	1.01	2.05E-02
UN 2	2.75-2.76 (<i>s</i>)	↓	-1.30	±	1.02	1.55E-02
UN 3	3.37-3.38 (<i>s</i>)	↓	-1.25	±	0.962	3.03E-02
UN 4	3.38-3.384 (<i>s</i>)	↓	-1.11	±	0.945	9.69E-03
UN 5	4.29-4.30 (<i>m</i>)	↓	-1.19	±	0.955	2.00E-02
UN 6	4.42-4.45 (<i>m</i>)	↓	-1.01	±	0.935	9.69E-03
UN 7	7.84-7.85 (<i>s</i>)	↓	-0.989	±	0.933	4.81E-02

Em suma, considerando os extratos lipídicos e aquosos, verificou-se que a ativação do oncogene MYC promoveu um efeito notório no metabolismo dos murganhos MYC. De um modo geral, observaram-se alterações em aminoácidos, compostos de colina, nucleótidos, entre outros. O efeito da ativação do oncogene MYC no metabolismo global dos murganhos em estudo encontra-se resumido na Figura 3.59, onde estão discriminados os metabolitos que se encontraram alterados em ambos os tipos de extratos.

Efeito da ativação do oncogene MYC em murganhos



	Metabolito	ES	<i>p-value</i>
	• (CH ₂) _n ácidos gordos	-1.80	6.99E-03
	• Glutamina	-1.43	5.66E-03
	• Hipotaurina	-1.32	2.66E-02
	• Isoleucina	-1.39	2.66E-02
	• UDP ou UTP	-1.43	9.69E-03
	• UDP-GalNAc	-1.39	1.25E-02
	• Uridina	-1.12	3.10E-02
	• Colesterol livre ou esterificado	1.83	2.95E-03
	• Glicerofosfocolina	1.11	5.66E-03
	• Glutamato	1.07	2.94E-02
	• Prolina	1.05	4.34E-02
	• Succinato	1.22	3.67E-02

Figura 3.59 – Alterações metabólicas resultantes da ativação do gene MYC, no metabolismo de murganhos MYC com cancro pancreático desenvolvido.

Recorda-se que não são encontrados estudos na literatura que estudem o efeito da ativação do oncogene MYC no desenvolvimento do PC, através do metabolismo de murganhos, pelo que os resultados serão comparados com os estudos existentes para o tumor hepático e pulmonar e, ainda, para o neuroblastoma em murganhos. As variações metabólicas destacadas nos estudos do PC em humanos também serão comparadas com as variações descritas no caso destes murganhos.

Sabe-se que tumores que resultem de uma expressão anormal do gene MYC, normalmente, apresentam uma dependência celular de glutamina, pois utilizam-na em diversos processos anabólicos (*e.g.* síntese proteica e de ácidos nucleicos, dador de nitrogénio, biossíntese de GSH e fonte de energia, através da sua intervenção anapleurótica no ciclo TCA). Neste caso, a diminuição da glutamina pode resultar num aumento de glutamato, através do processo de transaminação, catalisado pela enzima glutaminase. Este facto é concordante com estudos do tumor hepático, nos quais se observou um aumento de glutamina derivado da diminuição e do aumento das atividades das enzimas glutamina sintase e glutaminase dependente de fosfato, respetivamente (110). Alguns estudos da literatura, sobre o PDAC, justificaram que o aumento do glutamato está relacionado com a necessidade deste metabolito ser utilizado como mediador da ativação do recetor AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) (141). Esta ativação glutamato-AMPA promove a invasão e a migração das células tumorais, por ativação da via MAPK, pelo que o glutamato funciona como uma molécula reguladora da agressividade tumoral.

A diminuição da glutamina poderá relacionar-se com o aumento de succinato, através da sua intervenção anapleurótica no ciclo TCA. Assim, o aumento do succinato relaciona-se com o aumento do ciclo TCA, o que é coerente com a ativação desta via metabólica no estudo do tumor hepático em murganhos MYC. No entanto, este é uma observação controversa na literatura, pois alguns estudos mostraram uma ausência de alteração ou uma diminuição do fluxo do ciclo TCA, sendo que em modelos de murganhos KRAS se verificou a manutenção do nível de metabolitos intervenientes nesta via (*e.g.* succinato, fumarato, malato e α -cetoglutarato) (108), e em linhas celulares humanas de PC se verificou a inibição da expressão de várias enzimas intervenientes nesta via metabólica (*e.g.* aconitase, isocitrato desidrogenase, entre outras) (142). Contrariamente, outros estudos, em células humanas e de ratos, salientaram que os tumores que apresentam uma

sobre-expressão dos oncogenes KRAS e MYC (caso do PC), ao possuírem uma dependência celular em glutamina, apresentam um consequente aumento do fluxo do ciclo TCA, visto que a glutamina é transaminada a glutamato, sendo que este é convertido a α -cetoglutarato, pela ação da enzima glutamato desidrogenase (143-145). Além destes estudos, existem outros que relacionaram o redirecionamento da glutamina para o ciclo TCA com o estado de hipoxia, resultante da baixa vascularização dos tecidos tumorais (146-148). Na carcinogénese, como existe uma reduzida disponibilidade de oxigénio, há a inibição da oxidação do piruvato e por conseguinte há a diminuição da produção de acetil-CoA a partir da glucose (147). Contudo, o fluxo do ciclo TCA não é prejudicado devido ao aumento da disponibilidade de α -cetoglutarato, proveniente da glutamina (147). Assim, nos tecidos tumorais, o estado de hipoxia e o ciclo do TCA regulam-se mutuamente, sendo que o succinato é um dos metabolitos que regula diretamente a resposta transcripcional à situação de hipoxia (o fumarato e o oxaloacetato também) (146). Resumidamente, o succinato inibe o reconhecimento das subunidades α do fator induzido por hipoxia (*hypoxia inducible factor*, HIF) pela E3-ubiquitina ligase e inibe consequentemente a degradação deste fator pelo proteossoma. Desta forma, estas subunidades do HIF migram para o núcleo, dimerizam com as subunidades β e ativam a resposta transcripcional de compensação da situação de hipoxia. Em suma, o aumento do succinato resultará, muito provavelmente, do aumento do fluxo do ciclo TCA e da resposta celular face ao ambiente de hipoxia.

O aumento da prolina foi ao encontro da literatura, pois encontra-se descrito que o oncogene MYC regula a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de prolina, a partir de glutamina (149,150). Assim, os tumores que apresentam uma sobre-expressão deste oncogene, apresentam as enzimas envolvidas na síntese de prolina aumentadas (*e.g.* 1-pirrolina-5-carboxilato sintase) e as enzimas da sua degradação diminuídas (*e.g.* 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase e prolina desidrogenase/oxidase) (149). O consequente aumento da biossíntese de prolina mostrou ser importante para o desenvolvimento de vários tumores, como o linfoma, mamário, da próstata e do pulmão (150). Salienta-se que o aumento de prolina não foi coerente com o aumento de glutamato verificado, visto que este é um dos precursores prolina, através da formação de 1-pirrolina-5-carboxilato.

A diminuição da hipotaurina indica uma menor produção de taurina, visto que este metabolito é um intermediário da conversão de cisteína em taurina, pela ação da enzima sulfinoalanina descarboxilase. Esta observação poderá indicar uma menor disponibilidade de cisteína para a conversão em questão, pois poderá estar a ser utilizada preferencialmente noutro processo, como por exemplo, a produção de GSH. Apesar dos níveis de GSH não se terem alterado significativamente entre murganhos, a sua produção justificaria, ainda, a diminuição de glutamina, conforme será explicado no próximo capítulo.

Os níveis diminuídos de isoleucina nos murganhos MYC poderão resultar da sua elevada utilização para a biossíntese de proteínas. Na literatura salientou-se que o carácter inflamatório do PC promoveu a biossíntese de proteínas pro-inflamatórias a partir de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina e valina) (151). Este mecanismo pode ser responsável pela desregulação no balanço dos aminoácidos ramificados, de um modo geral, pois a taxa de utilização pode tornar-se superior à sua taxa de disponibilidade, visto que esta última depende da sua ingestão na dieta (são aminoácidos essenciais). Assim, vários tumores apresentaram baixos níveis de aminoácidos ramificados (151).

Por último, a diminuição de uridina e dos seus compostos derivados poderá resultar do uso elevado de UDP-GlcNAc como fonte de N-acetilglucosamina para o processo de o-glicosilação de proteínas, catalisado pela ação da enzima O-GlcNAc transferase (OGT). Esta diminuição de UDP-GlcNAc reflete-se na diminuição de UDP-GalNAc, visto que ambos os metabolitos podem ser convertidos pela ação da enzima UDP-GlcNAc-4-epimerase. Recorda-se que a diminuição de UDP-GlcNAc foi observada no metabolismo de murganhos KRAS, conforme discutido no Capítulo 3.2.2. Desta forma, a diminuição de UDP e/ou UTP justifica-se pelo seu maior consumo na reação de formação de UDP-GlcNAc a partir de N-acetil-glucosamina-1-fosfato (reação catalizada pela enzima UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase), na via metabólica HBP. Este maior consumo de UDP e/ou UTP conduz à diminuição da própria uridina, pois este nucleosídeo é o precursor da via de renovação das pirimidinas. Na literatura, um dos estudos em linhas celulares humanas de PC demonstrou que a concentração de UDP-GlcNAc e UDP-GalNAc nas células tumorais era menor do que nas células saudáveis, pelo que estes metabolitos estariam a ser utilizados no processo de o-glicosilação, importante para a capacidade anti-apoptótica, através da ativação do fator de transcrição NF- κ B, e, por conseguinte, para a

proliferação tumoral e metastatização (152). O outro estudo da literatura provou que a progressão carcinogénica deste tumor relacionava-se com o aumento da expressão da enzima OGT e, conseqüentemente, com o aumento do processo de o-glicosilação (153).

3.3.3. Efeito da ativação dos oncogenes KRAS e MYC

A comparação dos murganhos MYCRASoil com os murganhos MYCRASlam permitiu compreender as alterações do perfil metabólico que adviram da ativação do oncogene MYC, quando o oncogene KRAS já se encontrava ativo, e a consequente influência que esta ativação teve no papel que o oncogene KRAS desempenha no desenvolvimento e metabolismo associado ao PC. Com a análise visual comparativa dos espectros dos extratos lipídicos verificaram-se várias diferenças entre o perfil metabólico dos grupos de murganhos em questão (Figura 3.60). Assim, os murganhos MYCRASlam distinguiram-se, por um lado, pela diminuição de colesterol (livre ou esterificado) e fosfatidilcolina e, por outro, pelo aumento de ácidos gordos, conforme se observa através do aumento da intensidade dos sinais destes lípidos.

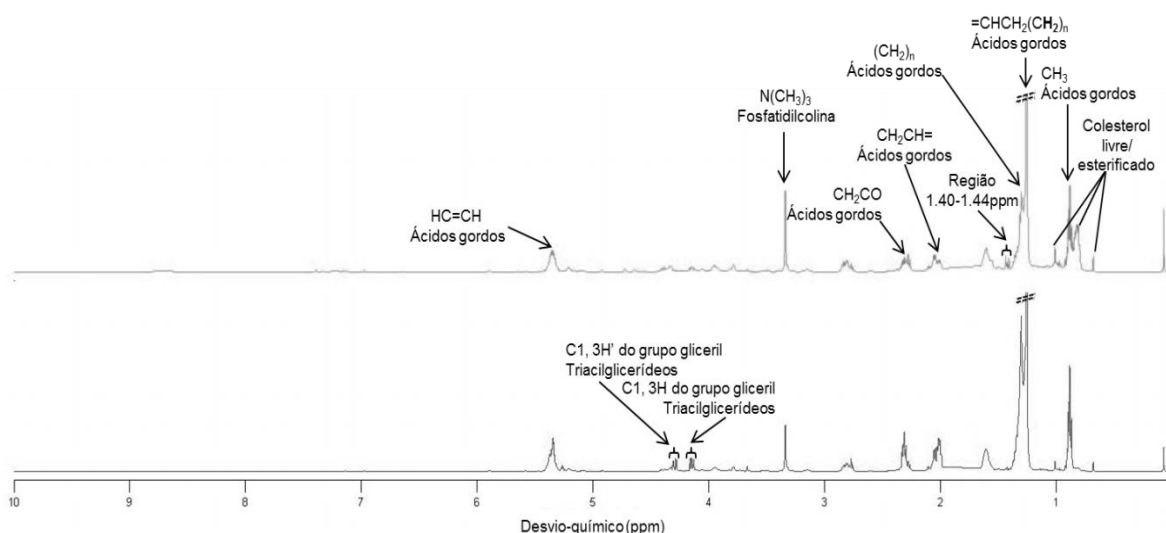


Figura 3.60 - Espectro de RMN de ¹H médio de extratos aquosos de pâncreas de (A) murganhos MYCRASoil e (B) murganhos MYCRASlam.

A análise MVA da Matriz 1 demonstrou uma total sobreposição entre ambas as classes de murganhos, pelo que não se observou nenhuma tendência de separação (Figura 3.61, B). Deste modo, a robustez do modelo associado à análise PLS-DA foi negativa ($Q^2 = -0.210$), reforçando a ideia de que a ativação conjunta do oncogene MYC e KRAS não teve impacto no metabolismo de murganhos com PC.

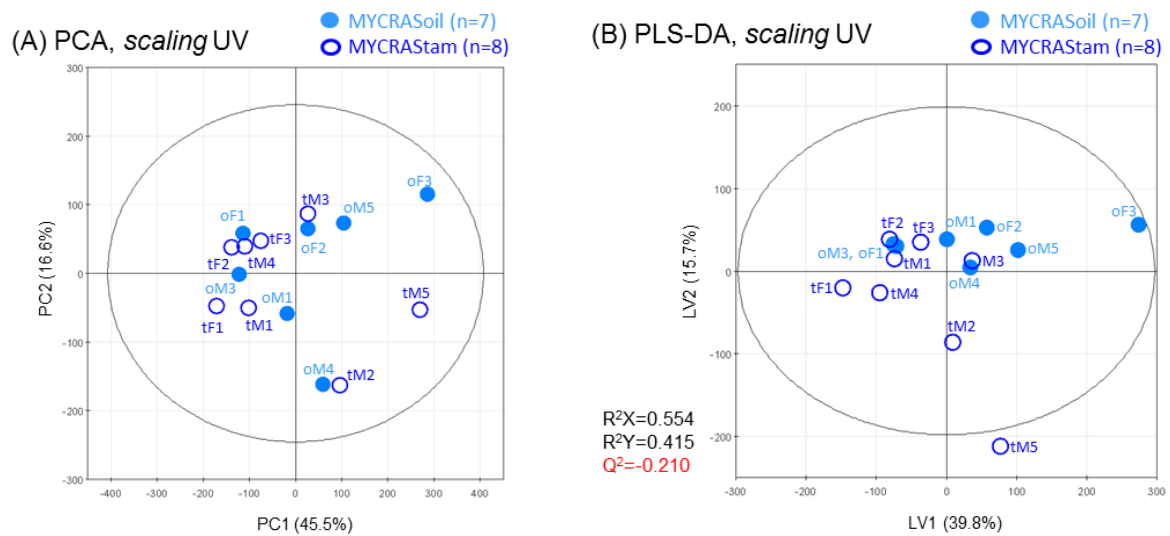


Figura 3.61 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA dos espectros de extratos lipídicos (Matriz 1, toda a janela espectral) de murganços MYCRASoil e MYCRASlam.

A análise MVA (Figura 3.62) com seleção de variáveis aplicada aos dados originais (16.37% dados selecionados), não revelou melhorias na separação entre os grupos de murganços. Como tal, a robustez do modelo associado à análise PLS-DA continuou muito baixa ($Q^2=0.101$).

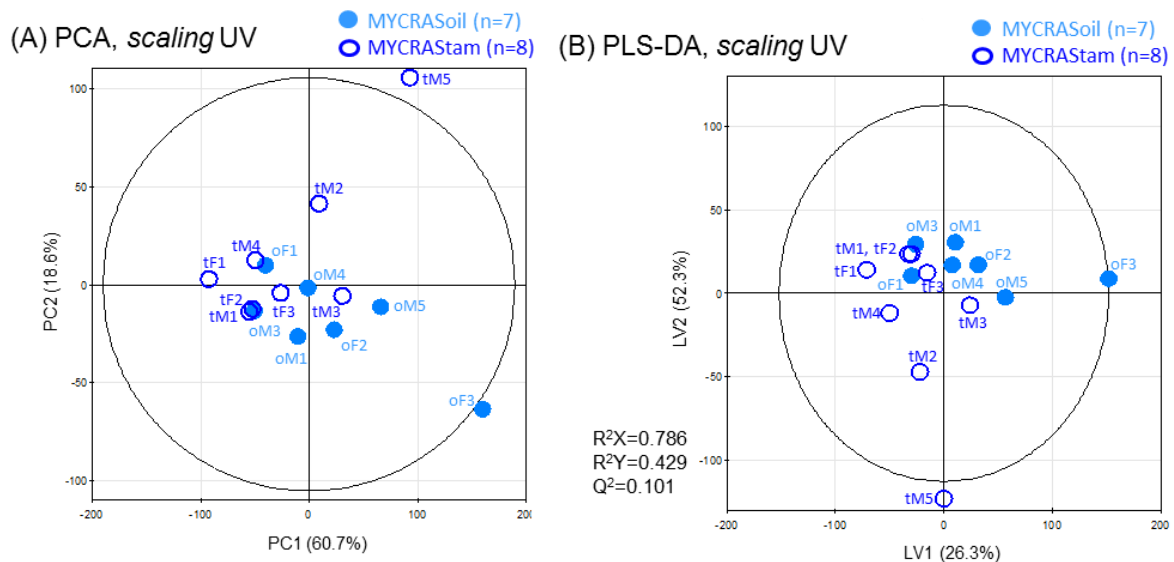


Figura 3.62 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA, com seleção de variáveis, dos espectros de extratos lipídicos (Matriz 1) de murganços MYCRASoil e MYCRASlam.

A análise MVA aplicou-se à Matriz 2, sendo que a separação entre os grupos de murganços não melhorou (Figura 3.63, A e B), o que se refletiu na robustez negativa do modelo PLS-DA ($Q^2=-0.210$). Apesar da robustez do modelo ser negativa, procedeu-se à

análise do gráfico de *loadings* em LV1, dada a importância da comparação destes grupos de murganhos (Figura 3.63, C). Deste modo, os sinais mais relevantes, para a distribuição amostral, caracterizaram o grupo MYCRAStam pelo aumento de esfingomielinina e diminuição de fosfatidilcolina e grupo gliceril pertencente a fosfolípidos e a triacilglicerídeos.

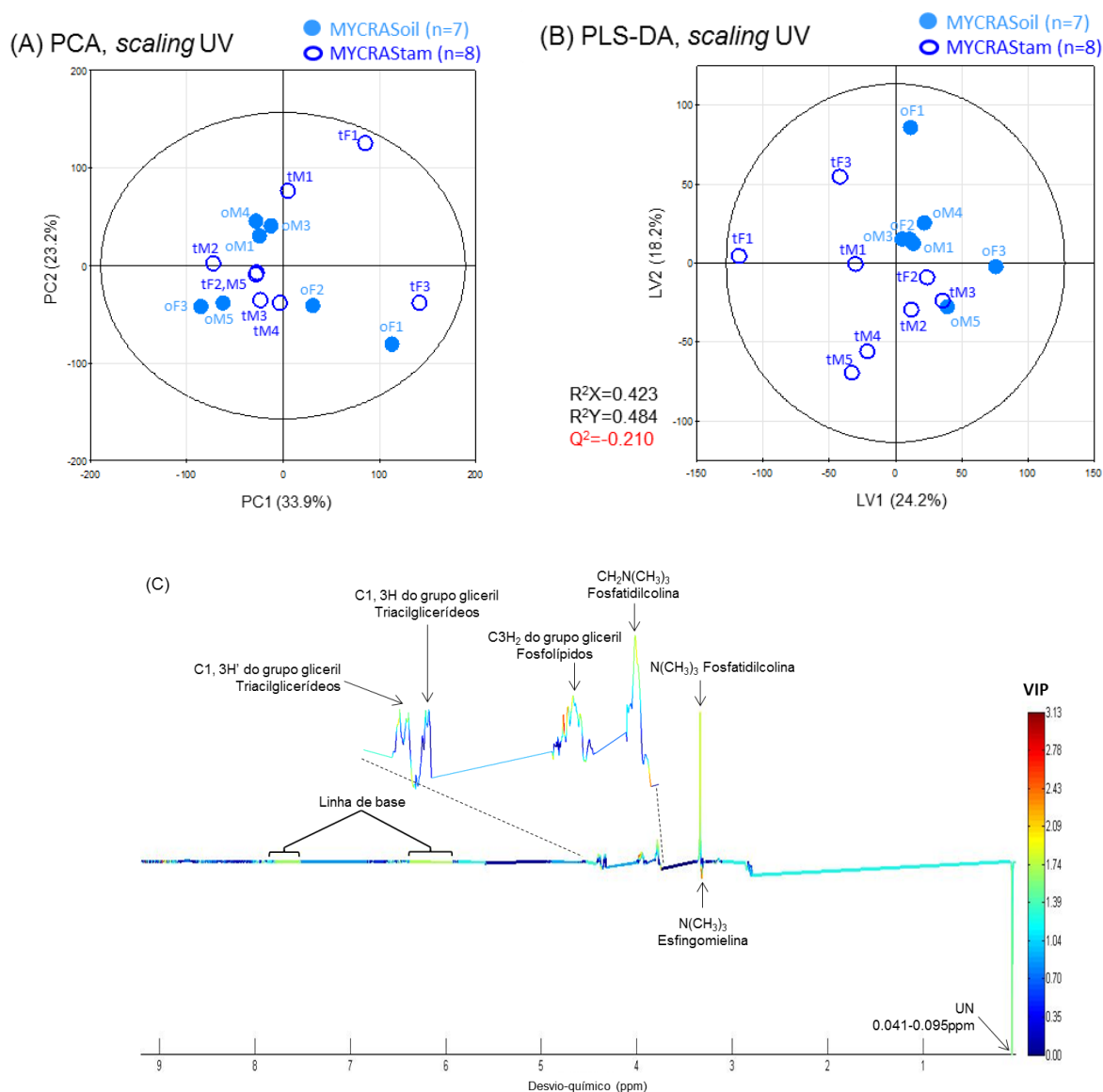


Figura 3.63 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA da Matriz 2 (regiões espectrais sem sobreposição com o espectro do óleo) dos espectros de extratos lipídicos de murganhos MYCRAStam e MYCRAStam. (C) Representação dos *loadings* de LV1 resultantes da análise PLS-DA.

A seleção de variáveis aplicou-se aos dados originais (27.17% dados selecionados). Na análise PCA continuou a não ser revelada qualquer tipo de separação entre os diferentes grupos de murganhos (Figura 3.64, A). Na análise PLS-DA verificou-se a diminuição da

dispersão intragrupal dos murganhos MYCRAsoil, o que poderá indicar que a presença dos sinais do óleo gera variabilidade nas amostras (Figura 3.64, B). Consequentemente, observou-se um ligeiro aumento da robustez ($Q^2=0.153$), contudo esta continuou a ser muito baixa.

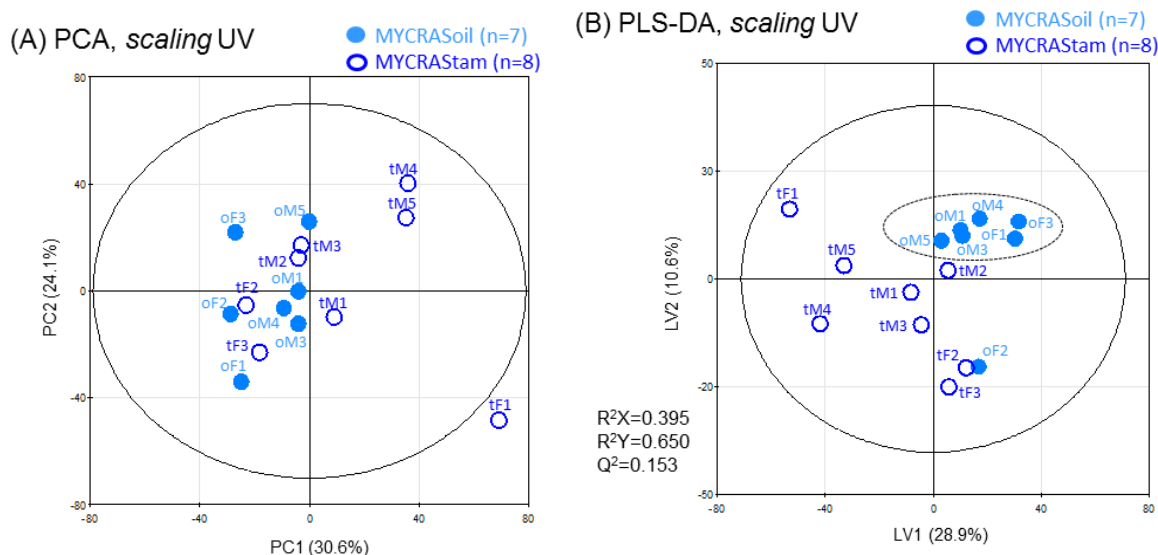


Figura 3.64 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA, com seleção de variáveis, da Matriz 2 dos espectros de extratos lipídicos de murganhos MYCRAsoil e MYCRAStam

A análise da projeção dos *loadings* em LV1 (Figura 3.65) revelou um baixo número de metabolitos com elevado peso ($VIP > 1$) na separação das classes amostrais. Assim, o grupo de murganhos MYCRAStam possuía aumentado o sinal de esfingomiélin e diminuídos os vários sinais de fosfatidilcolina, ($-N(CH_3)_3$, $-CH_2N(CH_3)_3$) e de fosfolípidos (grupo gliceril).

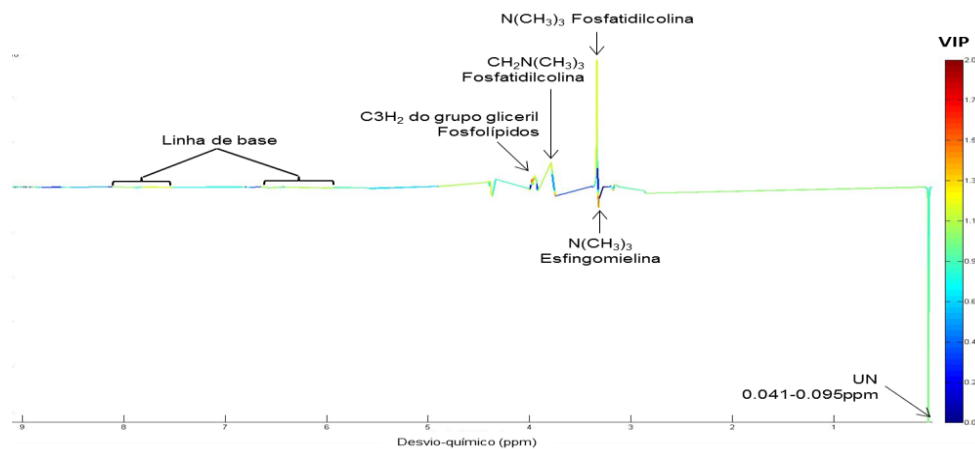


Figura 3.65 - Representação dos *loadings* de LV1 resultantes da análise PLS-DA, com seleção de variáveis, da Matriz 2 de extratos lipídicos de murganhos MYCRAsoil e murganhos MYCRAStam.

Por fim, aplicou-se a análise PLS-DA à Matriz 3. Contudo, ambas as análises PLS-DA, sem e com seleção de variáveis (13.88% dos dados selecionados), mostraram uma total sobreposição amostral, o que se refletiu na baixa robustez de ambos os modelos (Figura 3.66). Deste modo, não se procedeu à projeção e análise dos *loadings*.

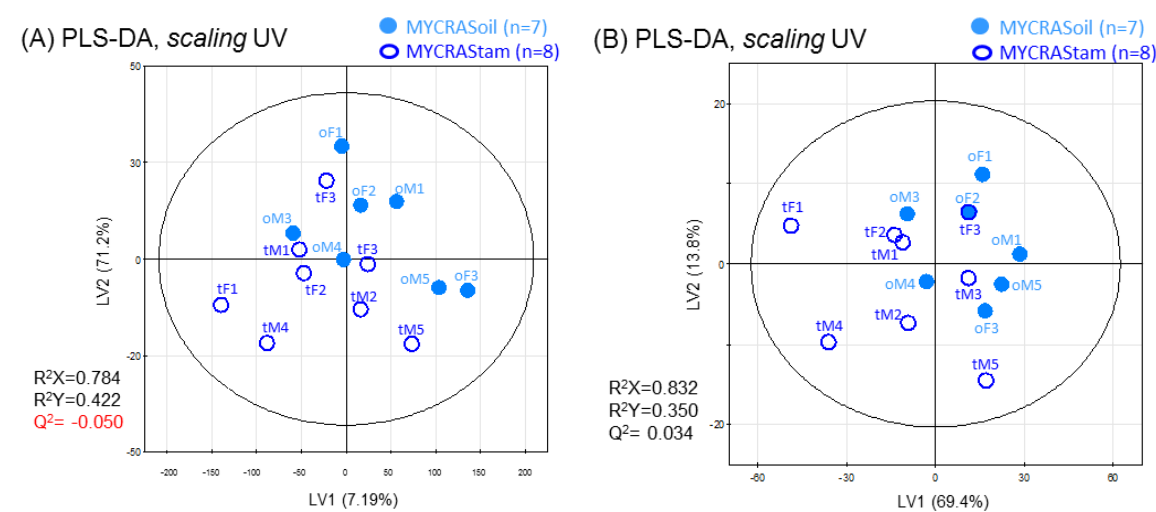


Figura 3.66 - Gráficos de *scores* de PLS-DA, (A) sem e (B) com seleção de variáveis, da Matriz 3 (regiões espectrais da colina e compostos de colina) dos espectros de extratos lipídicos de murganhos MYCRASoil e MYCRASlam.

Em resumo, recordam-se os seus valores de robustez (Q^2) dos modelos da análise PLS-DA (Tabela 3.16). O melhor modelo obteve-se quando são consideradas as regiões sem sobreposição com o espectro do óleo e se aplica a seleção de variáveis aos dados ($Q^2=0.153$). No entanto, a sua robustez é muito baixa, o que indica que a ativação do oncogene MYC, na presença do oncogene KRAS, atenua as alterações no metabolismo lipídico provocadas pela ativação deste último oncogene, havendo sinergismo destes oncogenes. Deste modo, não foi aplicada a UVA a nenhum dos modelos destacados na Tabela 3.16.

Tabela 3.16 - Robustez dos modelos estatísticos resultantes da análise PLS-DA da comparação do perfil lipídico entre murganhos MYCRASoil e MYCRASlam.

		Robustez (Q^2) dos modelos da análise PLS-DA da comparação dos murganhos MYCRASlam vs. MYCRASoil	
		Sem seleção de variáveis	Com seleção de variáveis
Regiões consideradas na construção da matriz	Todo o espectro	-0.210	0.101 (16.37% dados originais selecionados)
	Regiões sem sobreposição com o espectro do óleo	-0.210	0.153 (27.17% dados originais selecionados)
	Regiões da colina e dos compostos de colina	-0.050	0.034 (13.88% dados originais selecionados)

As alterações nos espectros dos extratos aquosos dos murganhos MYCRAS destacaram-se por ligeiras diferenças na intensidade de alguns sinais (Figura 3.67). No espectro dos murganhos MYCRAS_{Stam} observou-se a diminuição de creatina (3.04 e 3.93 ppm) e creatina fosfato (3.05 ppm) e o aumento da glicina (3.56 ppm). Entre os espectros de ambos os grupos de murganhos, salientou-se a inversão de intensidades entre os sinais de alanina (1.48 ppm) e de treonina ou lactato (1.33 e 1.34 ppm, respetivamente).

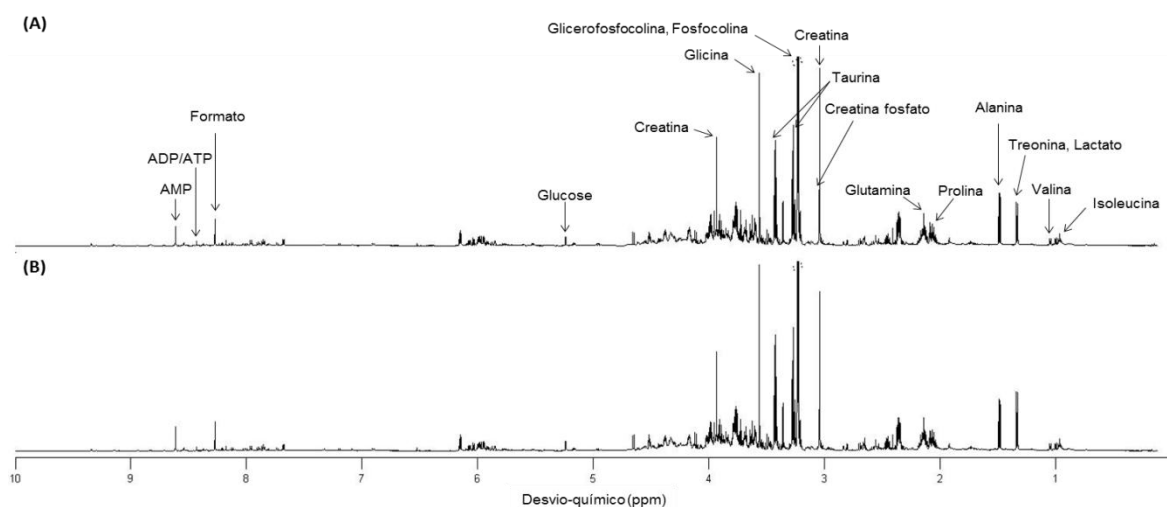


Figura 3.67 - Espectro de RMN de ^1H médio de extratos aquosos de pâncreas de (A) murganhos MYCRASoil e (B) murganhos MYCRAS_{Stam}.

A análise PCA (Figura 3.68, A) não relevou qualquer tipo de separação entre os diferentes grupos de murganhos, havendo uma elevada sobreposição amostral. A análise PLS-DA (Figura 3.68, B) diminuiu a sobreposição amostral e destacou uma tendência de separação em LV1, contudo não era real ($Q^2 = -0.186$). Por último, foi notória uma maior dispersão intra-amstral no grupo dos murganhos MYCRAS_{Stam}, o que representou uma maior variabilidade biológica destas amostras, pelo que seria interessante o conhecimento da caracterização histológica das amostras.

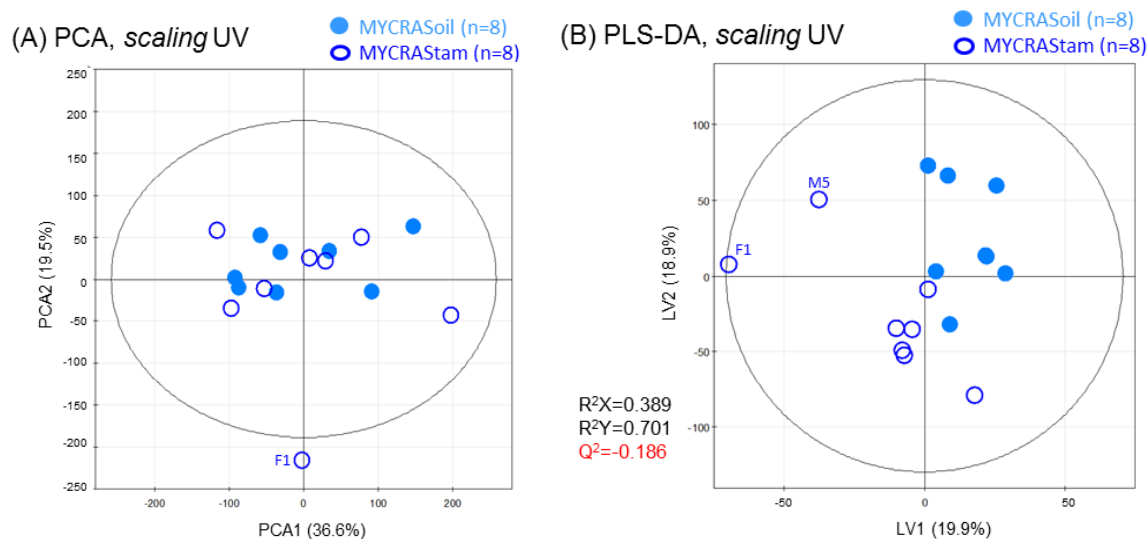


Figura 3.68 – Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA dos espectros de extratos aquosos de murganhus MYCRASoil e MYCRASlam.

A análise MVA repetiu-se com seleção de variáveis (24.01% dados selecionados) e a separação entre os diferentes grupos melhorou na análise PCA e PLS-DA, havendo uma ligeira tendência de separação em PC1 e LV1, respetivamente (Figura 3.69). Assim, a robustez deste último modelo aumentou e tornou-se razoável ($Q^2=0.368$). Conforme observado anteriormente, o grupo de murganhus MYCRASlam apresentou uma maior dispersão intra-amstral.

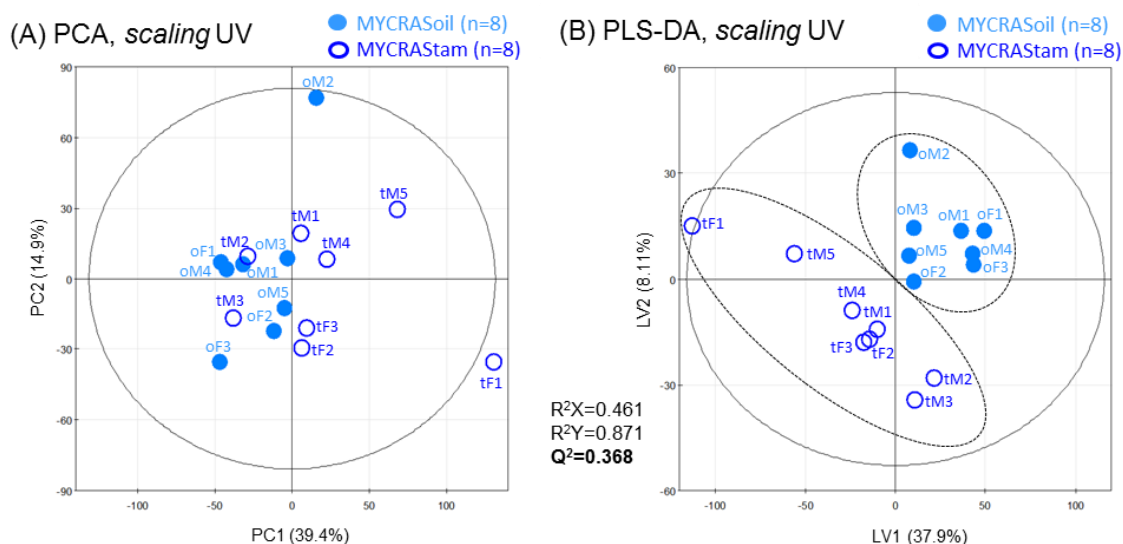


Figura 3.69 - Gráficos de *scores* de (A) PCA e (B) PLS-DA, com seleção de variáveis, dos espectros dos extratos aquosos de murganhus MYCRASoil e MYCRASlam.

O gráfico da projeção dos *loadings* representou-se relativamente ao componente LV1 (Figura 3.70). A sua análise revelou que a glutamina era o metabolito com o maior peso para a separação amostral, encontrando-se aumentada no grupo MYCRAS_{tam}, o que sugeriu que a ativação do oncogene MYC pode ter promovido o seu aumento. Nos murganhos MYCRAS_{tam} verificou-se o aumento dos sinais de treonina ou lactato, taurina, glucose e vários metabolitos da região 3.80 ppm (*e.g.* alanina e uridina) e da região 3.90 ppm (*e.g.* fenilalanina e tirosina). Por outro lado, neste mesmo grupo verificou-se a diminuição dos sinais de fosfocolina, AMP e formato, com maior valor de VIP, e prolina, creatina, glicina e GPC.

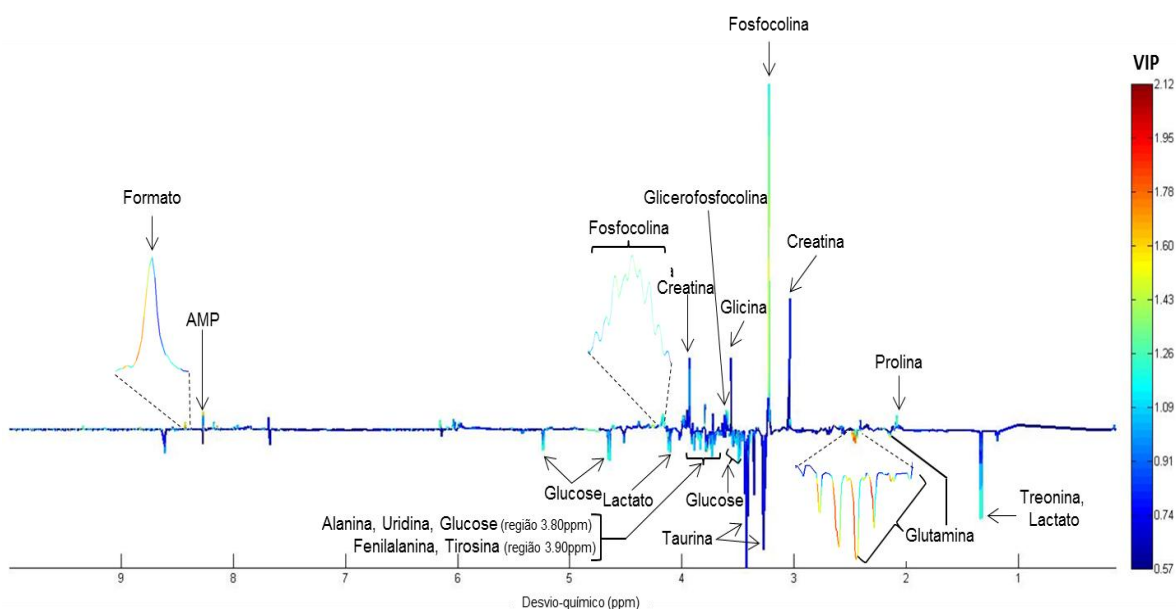


Figura 3.70 - Representação dos *loadings* em LV1 resultantes da análise PLS-DA, com seleção de variáveis, dos espectros de extratos aquosos de murganhos MYCRAS_{oil} e MYCRAS_{tam}.

Com a UVA verificou-se que o metabolismo de murganhos MYCRAS_{tam} caracteriza-se por: a) aumento de glutamina, GSH e succinato e b) diminuição de compostos de colina, fosfocolina e GPC, e de dois sinais sem identificação atribuída (Tabela 3.17). Assim, verificou-se que a ativação do oncogene MYC, quando a ativação do oncogene KRAS, induz um ligeiro efeito no metabolismo dos murganhos MYCRAS.

Tabela 3.17 - Metabolitos significativamente alterados ($p\text{-value} < 0.05$, $ES > ES\text{ erro}$) devido à ativação dos oncogenes MYC e KRAS no metabolismo de murganhos MYCRAS; UN: *unknown*; *s*: singuleto, *t*: tripleto, *m*: multipleteo.

Identificação do metabolito		MYCRAS _{Stam} (n=8) vs. MYCRAS _{Soil} (n=8)				<i>p-value</i>
Nome	δ/ppm (multiplicidade)		ES	\pm	ES error	
Fosfocolina e GPC	3.22 (<i>s</i>)	↓	-1.06	\pm	1.05	4.99E-02
Glutamina	2.45(<i>m</i>)	↑	1.71	\pm	1.14	1.04E-02
GSH	2.17(<i>m</i>)	↑	1.42	\pm	1.10	2.07E-02
Succinato	2.41 (<i>s</i>)	↑	1.29	\pm	1.08	4.99E-02
UN 1	8.41-8.42 (<i>s</i>)	↓	-1.13	\pm	1.6	4.99E-02
UN 2	8.82-8.84 (<i>t</i>)	↓	-1.15	\pm	1.06	4.99E-02

Para terminar este capítulo, resume-se o efeito da ativação dos oncogenes KRAS e MYC no metabolismo de compostos apolares e polares dos murganhos em estudo. Deste modo, os metabolitos que se alteraram significativamente em ambos os tipos de extratos apresentam-se na Figura 3.71. Salienta-se que as variações são relativas aos murganhos MYCRAS_{Stam}, nos quais os oncogenes KRAS e MYC se encontravam ativos.

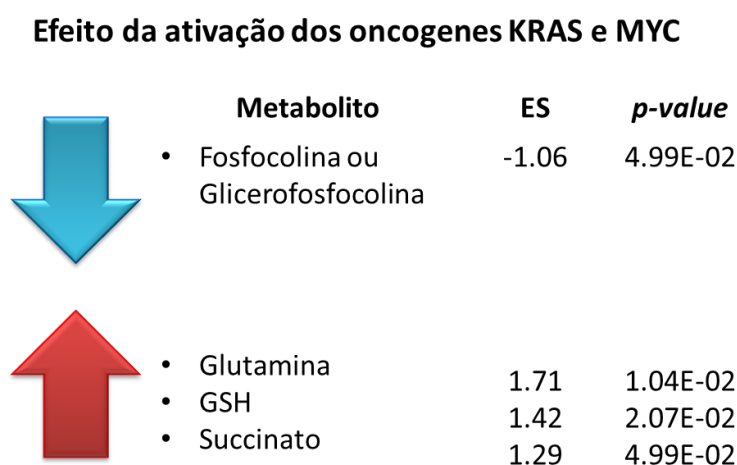


Figura 3.71 - Alterações metabólicas significativas, resultantes da ativação dos oncogenes KRAS e MYC, no metabolismo de murganhos MYCRAS com cancro pancreático desenvolvido.

Antes de mais, recorda-se que não existem estudos metabólicos ou metabolómicos na literatura que se debrucem sobre o efeito da ativação de ambos os oncogenes no metabolismo de murganhos. Assim, estes resultados serão comparados com as variações metabólicas produzidas pela ativação individual de cada oncogene, em murganhos, e variações observadas no PC em humanos (estudos em linhas celulares, sobretudo).

Conforme é possível observar pelo baixo número de metabolitos alterados, a ativação do oncogene MYC, aquando a ativação do oncogene KRAS, não induziu muitas alterações no metabolismo. Contrariamente ao observado neste caso, o efeito da ativação individual do oncogene MYC induziu uma alteração do perfil metabólico dos murganhos mais notória, conforme se verificou ao longo do capítulo anterior.

A seguinte discussão reflete uma tentativa de interpretação das variações metabólicas no funcionamento do metabolismo dos murganhos MYCRAS. Em primeiro lugar, destacou-se a contraditória variação da GPC relativamente aos murganhos MYC. Este modelo de murganhos em questão caracterizou-se por uma diminuição deste composto e de fosfocolina, o que poderá refletir uma menor síntese ou um maior consumo deste tipo de metabolitos. Na literatura, um dos estudos de murganhos KRAS com PC desenvolvido demonstrou uma diminuição de vários ácidos gordos no tecido pancreático, conforme mencionado na introdução (108). Por outro lado, alguns estudos que incidiram sobre o PC em humanos, verificaram um aumento da produção de lípidos de um modo geral (*e.g.* ácidos gordos e colesterol), coerente com o aumento da expressão do gene que codifica para a enzima ácido gordo sintase e do consequente aumento da expressão desta proteína nas células e no plasma sanguíneo (28,154). No caso dos murganhos MYCRAS, a biossíntese de ácidos gordos poderá estar a ser potenciada pela maior disponibilidade citosólica de acetil-CoA, visto que há um maior fluxo do ciclo TCA (indicado pelo aumento de succinato) e consequentemente há uma maior disponibilidade de citrato para ser convertido em oxaloacetato (reação catalisada pela enzima ATP citrato liase). Geralmente, a biossíntese *de novo* de lípidos nos tecidos tumorais, sobretudo dos compostos derivados de colina, é utilizada na formação das membranas celulares das novas células formadas e em processos de sinalização importantes para a proliferação tumoral (28). Desta forma, nos murganhos MYCRAS, este tipo de lípidos poderão estar a ser utilizados em processos celulares, como os anteriormente descritos, a um ritmo elevado, o que poderá refletir-se na sua diminuição dos seus níveis.

Em segundo lugar, salienta-se que o aumento de succinato foi uma variação comum com o modelo de murganhos MYC e pode refletir um aumento do fluxo do ciclo TCA e da resposta à situação de hipoxia, conforme discutido no capítulo anterior.

Em terceiro lugar, o característico redirecionamento de glutamina para diversas vias metabólicas, mencionado anteriormente, em tumores com uma sobre-expressão dos oncogenes KRAS e MYC, representa a possível causa para o aumento de GSH observado no metabolismo dos murganhos MYCRAS. No entanto, há que salientar que os diferentes oncogenes possuem diferentes mecanismos para aumentarem os níveis de GSH: o oncogene MYC potencia uma maior disponibilidade de glutamato para a biossíntese de GSH (155), ao passo que o oncogene KRAS promove o aumento da razão NADPH/NADP⁺, favorecendo a renovação dos níveis de GSH, através da redução de GSSG para GSH (35). Comparativamente à literatura, num dos estudos de murganhos, a inativação do oncogene KRAS não alterou os níveis de GSH (107), pelo que, neste caso, o oncogene MYC poderá ter um papel mais preponderante nesta variação, apesar dos níveis de GSH não terem sofrido variações significativas no metabolismo dos murganhos MYC. Em vários estudos de linhas celulares humanas do PC e de outros tipos de cancro (*e.g.* pulmonar e mama), a diminuição de glutamina, resultante da diminuição da expressão da enzima glutaminase ou de transportadores específicos (*e.g.* ASCT2 e SLC7A5), refletiu-se numa diminuição de GSH e no consequente aumento de espécies reativas de oxigénio (35,145). Recorda-se que o aumento dos níveis de GSH é característico de vários tipos de tumores, pois este metabolito é um anti-oxidante importante para combater o *stress* oxidativo característico do micro-ambiente tumoral e consequentemente é responsável pela resistência dos tecidos tumorais a terapias como a quimioterapia (156). No entanto, esperava-se que a utilização da glutamina noutras vias metabólicas se traduzisse numa diminuição deste metabolito (35). No entanto, no caso dos murganhos MYCRAS, verificou-se o aumento de glutamina, o qual é contraditório, não só ao aumento de succinato e GSH, mas também à variação observada no modelo de murganhos MYC. Este fenómeno poderá possivelmente ser justificado pelo aumento do transporte de glutamina, o que se reflete num aumento do fluxo de circulação deste aminoácido.

Deste modo, verificou-se que o efeito da ativação conjunta dos oncogenes KRAS e MYC, no metabolismo dos murganhos C57BL/6, reside sobretudo na regulação do metabolismo da glutamina. Assim, a glutamina parece ser redirecionada de modo a aumentar o fluxo do ciclo TCA, como possível resposta à situação de hipoxia, e a aumentar a biossíntese e renovação dos níveis de GSH. Por outro lado, a diminuição de compostos derivados de colina pode refletir o elevado ritmo de divisão e proliferação celular no PC.

4. Conclusão

A metabolómica por espectroscopia de RMN mostrou ser uma técnica sensível e capaz de distinguir o perfil metabólico do tecido pancreático dos diversos grupos de murganhos em estudo. Neste sentido, esta técnica permitiu identificar metabolitos característicos das patologias pancreáticas em estudo e correlacionar estas alterações metabólicas com o efeito da ativação dos oncogenes KRAS e MYC.

Com este trabalho, inicialmente, verificou-se que a ativação do oncogene KRAS tem um papel preponderante nas alterações metabólicas que ocorrem aquando do desenvolvimento e progressão de patologias pancreáticas. O perfil metabólico da pancreatite revelou variações características em vários metabolitos, sendo que algumas destas variações se destacaram pelo facto de apresentarem uma trajetória distinta das restantes condições em questão. Deste modo, o tecido com pancreatite distinguiu-se do tecido saudável pela diminuição de alanina, creatina, ácidos orgânicos, nomeadamente, formato e fumarato, nucleótidos, como AMP e UMP e, ainda, de niacinamida e, por outro lado, pelo aumento de ATP, fenilacetato e GSH. Além disso, foi possível diferenciar esta condição benigna (pancreatite) da condição neoplásica (PanIN) LG através da diminuição de alanina, creatina, UDP-glucose ou –glucuronato e aumento de fenilalanina. Como tal, os metabolitos anteriormente mencionados representam possíveis biomarcadores metabólicos identificativos do desenvolvimento de pancreatite aguda. A progressão das patologias neoplásicas pancreáticas, nomeadamente a evolução o grau das lesões neoplásicas PanIN e a evolução destas lesões para tumor pancreático, também apresentou um perfil metabólico característico e identificativo. Assim, à medida que as patologias pancreáticas evoluíam verificou-se uma diminuição de compostos de colina, fosfocolina e GPC, de fosfoetanolamina e, ainda, de glutamina, UDP-Glucose ou –Glucuronato, 2-fosfoglicerato e ascorbato e um aumento de 3-HBA. As variações refletidas na trajetória dos metabolitos, anteriormente mencionadas, representam possíveis padrões metabólicos que permitem monitorizar a progressão das patologias em questão. É necessário referir que o tumor PDA se distinguiu das restantes condições através de alterações nos hidratos de carbono glucose e sacarose, no ascorbato e na niacinamida, pois estes metabolitos aumentaram aquando o desenvolvimento das lesões PanIN e diminuíram com o desenvolvimento deste tumor.

Contudo, não foram observadas alterações metabólicas significativas para a distinção dos dois tumores pancreáticos estudados.

Em segundo lugar, foi possível verificar-se que a ativação do oncogene MYC potenciou alterações no metabolismo de murganhos através da diminuição dos aminoácidos glutamina e isoleucina, de hipotaurina, de uridina e compostos derivados, UDP ou UTP e UDP-GalNAc e de ácidos gordos (em termos do comprimento da cadeia carbonada) e do aumento de prolina, de GPC e de ácidos orgânicos como o glutamato e o succinato e de colesterol livre ou esterificado. Deste modo, a ativação do oncogene MYC refletiu um menor efeito no metabolismo lipídico comparativamente ao metabolismo de compostos polares.

A ativação do oncogene MYC quando o oncogene KRAS já se encontra presente refletiu uma pequena alteração do perfil metabólico dos murganhos, sugerindo uma atenuação mútua entre estes dois oncogenes. A ativação conjunta dos oncogenes MYC e KRAS caracterizou-se, apenas, pela diminuição de compostos de colina, fosfocolina e GPC, e pelo aumento de glutamina, glutatona e succinato. Salienta-se que a trajetória de variação da glutamina e da GPC neste modelo de murganhos foi contrária àquela observada no modelo de murganhos com, apenas, o oncogene MYC ativo.

Em suma, a ativação individual dos oncogenes KRAS e MYC produziu um maior efeito do que a ativação conjunta de ambos os oncogenes no perfil metabólico de murganhos com cancro pancreático. Futuramente seria muito interessante relacionarem-se os dados deste estudo metabolómico com um estudo histológico, de forma a compreender as alterações metabólicas características de cada tipo de célula, recordando que o tecido pancreático é citologicamente heterogéneo. Seguidamente, de modo a aumentar o impacto clínico destes resultados, seria muito interessante fazer-se a quantificação absoluta (mg de metabolito/g de tecido pancreático) dos metabolitos mais relevantes, idealmente tendo em conta o perfil histológico pancreático, como acima comentado. Por outro lado, seria importante repetir-se este estudo em mais grupos de murganhos MYC e MYCRAS para garantir a reprodutibilidade do estudo. Para terminar, a última fase da continuidade deste trabalho seria validar os biomarcadores metabólicos, anteriormente sugeridos, em tecido pancreático humano.

Bibliografia

1. Falasca M, Kim M, Casari I. Pancreatic cancer: Current research and future directions. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2016;1865:123–32
2. Sousa C, Kimmelman A. The complex landscape of pancreatic cancer metabolism. *Carcinogenesis*. 2014;35:1441–50
3. Kamisawa T, Wood L, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *The Lancet*; 2016;388:73–85
4. Serrao E, Kettunen M, Rodrigues T, Dzien P, Wright A, Gopinathan A, Gallagher F, Lewis D, Frese K, Almeida J, Howat W, Tuveson D, Brindle K. MRI with hyperpolarised [1-¹³C]pyruvate detects advanced pancreatic preneoplasia prior to invasive disease in a mouse model. *Gut*. 2015;0:465–75
5. Grant T, Hua K, Singh A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2016;144:241-75
6. Seeley R, Stephens T, Tate P. *Anatomy & Physiology*, 6.^a edição. Mc-Graw Hill Higher Education; 2003
7. Muniraj T, Jamidar P, Aslanian H. Pancreatic cancer: A comprehensive review and update. *Disease-a-Month*. 2013;59:368–402
8. Hingorani S, Wang L, Multani A, Combs C, Deramaudt T, Hruban R, Rustgi A, Chang S, Tuveson D. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*. 2005;7:469–83
9. Yadav D, Lowenfels A. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013;144:1252–61
10. Knudsen E, O'Reilly E, Brody J, Witkiewicz A. Genetic Diversity of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Opportunities for Precision Medicine. *Gastroenterology*. 2016;150:48–63
11. Ottenhof N, Wilde R, Maitra A, Hruban R, Offerhaus G. Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology Research International*. 2011;2011:1-16
12. Mann K, Ying H, Juan J, Jenkins N, Copeland G. KRAS-related proteins in pancreatic cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016; 168:29-42
13. Wood L, Hruban R. Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. *The Cancer Journal*. 2012;18:492–501
14. Yan L, McFaul C, Howes N, Leslie J, Lancaster G, Wong T, Threadgold J, Evans J, Gilmore I, Smart H, Lombard M, Neoptolemos J, Greenhalf W. Molecular analysis to detect pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk groups. *Gastroenterology*. 2005;128:2124–30
15. Skoudy A, Hernández-Muñoz I, Navarro P. Pancreatic ductal adenocarcinoma and transcription factors: Role of c-Myc. *Journal Gastrointestinal Cancer*. 2011;42:76–84

16. Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress T, Ellenrieder V. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *The EMBO Journal*. 2006;25:3714–24
17. Eilers M, Eisenman R. Myc 's broad reach. *Genes & Development*. 2008;22:2755–66
18. Dominguez-Sola D, Ying C, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway D, Gu W, Gautier J, Dalla-Favera R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*. 2007;448:445–51
19. Cowling V, Cole M. The Myc transactivation domain promotes global phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain independently of direct DNA binding. *Molecular and Cellular Biology*. 2007;27:2059–73
20. Bonal C, Thorel F, Ait-Lounis A, Reith W, Trumpp A, Herrera P. Pancreatic Inactivation of c-Myc Decreases Acinar Mass and Transdifferentiates Acinar Cells Into Adipocytes in Mice. *Gastroenterology*. 2009;136:309–19
21. Maitra A, Adsay N, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, Marzo A, Cameron J, Yeo C, Hruban R. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Modern Pathology*. 2003;16:902–12
22. Cairns R, Harris I, Mak T. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11:85–95
23. Lunt S, Heiden M. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2011;27:441–64
24. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144:646–74
25. Liang C, Qin Y, Zhang B, Ji S, Shi S, Xu W, Liu J, Xiang J, Liang D, Hu Q, Ni Q, Xu J, Yu X. Metabolic plasticity in heterogeneous pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016;1866:177-88
26. Bryant K, Mancias J, Kimmelman A, Der C. KRAS: Feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*. 2014;39:91–100
27. Daye D, Wellen K. Metabolic reprogramming in cancer: Unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2012;23:362–9
28. Swierczynski J, Hebanowska A, Sledzinski T. Role of abnormal lipid metabolism in development, progression, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20:2279–303
29. He T, Zhang Y, Jiang H, Li X, Zhu H, Zheng K. The c-Myc–LDHA axis positively regulates aerobic glycolysis and promotes tumor progression in pancreatic cancer. *Medical Oncology*. 2015;32:1–8

30. Shukla S, Gunda V, Abrego J, Haridas D, Mishra A, Soucek J, Chaika N, Yu F, Sasson A, Lazenby A, Batra S, Singh P. MUC16-mediated activation of mTOR and c-Myc reprograms pancreatic cancer metabolism. *Oncotarget*. 2015;6:19118–31
31. Gaglio D, Metallo C, Gameiro P, Hiller K, Danna L, Balestrieri C, Alberghina L, Stephanopoulos G, Chiaradonna F. Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Molecular systems biology*; 2011;7:1-15
32. Ying H, Kimmelman A, Lyssiotis C, Hua S, Chu G, Fletcher-sananikone E, Locasale J, Son J, Zhang H, Coloff J, Yan H, Wang W, Chen S, Zheng H, Paik J, Lim C, Guimaraes A, Eric S, Chang J, Hezel A, Perry S, Hu J, Gan B, Xiao Y, Asara J, Weissleder R, Wang Y. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*. 2012;149:656–70
33. Zhao D, Zou S, Liu Y, Zhou X, Mo Y, Wang P, Xu Y-H, Dong B, Xiong Y, Lei Q-Y, Guan K-L. Lysine-5 acetylation negatively regulates lactate dehydrogenase A and is decreased in pancreatic cancer. *Cancer Cell*. 2013;23:464–76
34. Morrish F, Isern N, Sadilek M, Jeffrey M, Hockenbery D. c-Myc activates multiple metabolic networks to generate substrates for cell-cycle entry. *Oncogene*. 2009;28:2485–91
35. Son J, Lyssiotis C, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, Perera R, Ferrone C, Mullarky E, Shyh Ng, Kang Ya, Fleming J, Bardeesy N, Asara J. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a Kras-regulated metabolic pathway. *Nature*. 2013;496:101–5
36. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Model & Mechanisms*. 2013;6:1353–63
37. Stine Z, Walton Z, Altam B, Hsieh A, Dang C. MYC, Metabolism and Cancer. *Cancer Discovery*. 2015;5:1024-39
38. Edmunds LR, Sharma L, Kang A, Lu J, Vockley J, Basu S, Uppala R, Goetzman E, Beck M, Scott D, Prochownik E. C-Myc programs fatty acid metabolism and dictates acetyl-CoA abundance and fate. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289:25382–92
39. Kamphorst J, Cross J, Fan J, Stanchina E, Mathew R, White E, Thompson C, Rabinowitz J. Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the f the United States of America*. 2013;110:8882–7
40. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, Van Veldhoven P, Waltregny D, Daniëls V, Machiels J, Vanderhoydonc F, Smans K, Waelkens E, Verhoeven G, Swinnen J. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Research*. 2010;70:8117–26

41. Guo J, White E. Autophagy is required for mitochondrial function, lipid metabolism, growth, and fate of KRASG12D-driven lung tumors. *Autophagy*. 2013;9:1636–8
42. Lock R, Roy S, Kenific C, Su J, Salas E, Ronen S, Debnath J. Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Molecular Biology of the Cell*. 2011;22:165–78
43. Kim S, Park H, Jeong H, Kim M, Kim M, Bae O, Baek S. Autophagy sustains the survival of human pancreatic cancer PANC-1 cells under extreme nutrient deprivation conditions. *Biochemical et Biophysical Research Communications*. 2015;463:205–10
44. Rausch V, Liu L, Apel A, Rettig T, Gladkikh J, Labsch S, Kallifatidis G, Kaczorowski A, Groth A, Gross W, Gebhard M, Schemmer P, Werner J, Salnikov A, Zentgraf H, Büchler M, Herr I. Autophagy mediates survival of pancreatic tumour-initiating cells in a hypoxic microenvironment. *Journal of Pathology*. 2012;227:325–35
45. Rosenfeldt M, O'Prey J, Morton J, Nixon C, MacKay G, Mrowinska A, Au A, Rai T, Zheng L, Ridgway R, Adams P, Anderson K, Gottlieb E, Sansom O, Ryan K. P53 Status Determines the Role of Autophagy in Pancreatic Tumour Development. *Nature* 2013;504:296–300
46. Neuzillet C, Tijeras-raballand A, Bourget P, Cros J, Couvelard A, Sauvanet A, Vullierme M, Tournigand C, Hammel P. State of the art and future directions of pancreatic ductal adenocarcinoma therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2015;155:80–104
47. Chiorean E, Von Hoff D, Reni M, Arena F, Infante J, Bathini V, Wood T, Mainwaring P, Muldoon R, Clingan P, Kunzmann V, Ramanathan R, Tabernero J, Goldstein D, McGovern D, Lu B, Ko A. CA19-9 decrease at 8 weeks as a predictor of overall survival in a randomized phase III trial (MPACT) of weekly nab-paclitaxel plus gemcitabine versus gemcitabine alone in patients with metastatic pancreatic cancer. *Annals of Oncology*. 2016;27:654–60
48. Foley K, Kim V, Jaffee E, Zheng L. Current progress in immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Letters*. 2016;381:244–51
49. Poruk K, Firpo M, Mulvihill S. Screening for Pancreatic Cancer. *Advances in Surgery*. 2014;48:115–36
50. Van Laethem J, Verslype C, Iovanna J, Michl P, Conroy T, Louvet C, Hamme P, Mitry E, Ducreux M, Maraculla T, Uhl W, Van Tienhoven G, Bachet J, Chal R, Hendlisz A, Bali M, Demetter P, Ulrich F, Aust D, Luttges J, Peeters M, Mauer M, Roth A, Neoptolemos J, Lutz M. New strategies and designs in pancreatic cancer research: Consensus guidelines report from a European expert panel. *Annals of Oncology*. 2012;23:570–6

51. He J, Page A, Weiss M, Wolfgang C, Herman J, Pawlik T. Management of borderline and locally advanced pancreatic cancer: Where do we stand? *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20:2255–66
52. Paulson A, Tran Cao H, Tempero M, Lowy A. Therapeutic advances in pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013;144:1316–26
53. Maeda A, Boku N, Fukutomi A, Kondo S, Kinoshita T, Nagino M, Uesaka K. Randomized phase III trial of adjuvant chemotherapy with gemcitabine versus S-1 in patients with resected pancreatic cancer: Japan Adjuvant Study Group of Pancreatic Cancer (JASPAC-01). *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2008;38:227–9
54. Garrido-Laguna I, Hidalgo M. Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nature Reviews-Clinical Oncology*. 2015;12:319–34
55. Hoff D, Ervin T, Arena F, Chiorean E, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin S, Ma W, Saleh M, Harris M, Reni M, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van E. Increased survival in pancreatic cancer with nab-Paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine*. 2015;369:1691–703
56. Hoff D, Ramanathan R, Borad M, Laheru D, Smith L, Wood T, Korn L, Desai N, Trieu V, Iglesias J, Zhang H, Soon-Shiong P, Shi T, Rajeshkumar N, Maitra A, Hidalgo M. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: A phase I/II trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29:4548–54
57. Komar G, Kauhanen S, Liukko K, Seppänen M, Kajander S, Ovaska J, Nuutila P, Minn H. Decreased blood flow with increased metabolic activity: A novel sign of pancreatic tumor aggressiveness. *Clinical Cancer Research*. 2009;15:5511–7
58. Peters M, Tseng J, Miksad R. Genetic Testing in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Implications for Prevention and Treatment. *Clinical Therapeutics*. 2016;38:1622–35
59. Nicholson J, Holmes E, Kinross J, Darzi A, Takats Z, Lindon J. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature*. 2012;491:384–92
60. Duarte I, Lamago I, Rocha C, Gil AM. NMR metabonomics for mammalian cell metabolism studies. *Bioanalysis*. 2009;1:1597–614
61. Dunn W, Broadhurst D, Atherton H, Goodacre R, Griffin J. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Society Reviews*. 2011;40:387–426
62. Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. Chemometrics in metabolomics-A review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta*. 2010;659:23–33

63. Beger R, Schnackenberg L, Holland R, Li D, Dragan Y. Metabonomic models of human pancreatic cancer using 1D proton NMR spectra of lipids in plasma. *Metabolomics*. 2006;2:125–34
64. Fang F, He X, Deng H, Chen Q, Lu J, Spraul M, Yu Y. Discrimination of metabolic profiles of pancreatic cancer from chronic pancreatitis by high-resolution magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance and principal components analysis. *Cancer Science*. 2007;98:1678–82
65. Kim K, Aronov P, Zakharkin S, Anderson D, Perroud B, Thompson I, Weiss R. Urine Metabolomics Analysis for Kidney Cancer Detection and Biomarker Discovery. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2009;8:558–70
66. Claudino WM, Quattrone A, Biganzoli L, Pestrin M, Bertini I, Di Leo A. Metabolomics: Available results, current research projects in breast cancer, and future applications. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25:2840–6
67. Chan E, Koh P, Mal M, Cheah P, Eu K, Backshall A, Cavill R, Nicholson J, Keun H. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *Journal of Proteome Research*. 2009;8:352–61
68. Denkert C, Budczies J, Weichert W, Wohlgemuth G, Scholz M, Kind T, Niesporekl S, Noskel A, Buckendahl A, Dietel M, Fiehn O. Metabolite profiling of human colon carcinoma-deregulation of TCA cycle and amino acid turnover. *Molecular Cancer*. 2008;7:1-15
69. Wu Y, Li L. Sample normalization methods in quantitative metabolomics. *Journal of Chromatography A*. 2016;1430:80–95
70. Bingol K, Brüschweiler R. Knowns and unknowns in metabolomics identified by multidimensional NMR and hybrid MS/NMR methods. *Current Opinion in Biotechnology*. 2017;43:17–24
71. Hendriks M, Eeuwijk F, Jellema R, Westerhuis J, Reijmers T, Hoefsloot H, Smilde A. Data-processing strategies for metabolomics studies. *Trends in Analytical Chemistry*. 2011;30:1685–98
72. Marchand J, Martineau E, Guitton Y, Dervilly-Pinel G, Giraudeau P. Multidimensional NMR approaches towards highly resolved, sensitive and high-throughput quantitative metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2017;43:49–55
73. Dietmair S, Timmins N, Gray P, Nielsen L, Krömer J. Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol. *Analytical Biochemistry*. 2010;404:155–64

74. Lindon J, Holmes E, Bollard M, Stanley E, Nicholson J. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers*. 2004;9:1–31
75. Teng Q. Structural biology, practical NMR applications. 2ª edição. Springer New York. 2013
76. Fan T, Lane A. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2016;92-93:18–53
77. Hu K, Ellinger J, Chylla R, Markley J. Measurement of absolute concentrations of individual compounds in metabolite mixtures by gradient-selective time-zero ^1H - ^{13}C HSQC with two concentration references and fast maximum likelihood reconstruction analysis. *Analytical Chemistry*. 2011;83:9352–60
78. Lewis I, Schommer S, Hodis B, Robb K, Westler W, Sussman M, Markley J. Method for Determining Molar Concentrations of Metabolites in Method for Determining Molar Concentrations of Metabolites in Complex Solutions from Two-Dimensional ^1H - ^{13}C NMR Spectra. *Analytical Chemistry*. 2007;79:9385–90
79. Giraudeau P. Quantitative 2D liquid-state NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2014;52:259–72
80. Dona A, Kyriakides M, Scott F, Shephard E, Varshavi D, Veselkov K, Everett J. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Computation and Structural Biotechnology Journal*. 2016;14:135–53
81. Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ. Statistical Methods for the Analysis of High-Throughput Metabolomics Data. *Computation and Structural Biotechnology Journal*. 2013;4:1–9
82. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *Journal of Proteome Research*. 2007;6:469–79
83. Liland K. Multivariate methods in metabolomics - from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2011;30:827–41
84. Gromski P, Muhamadali H, Ellis D, Xu Y, Correa E, Turner M, Goodacre R. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*. 2015;879:10–23
85. Izquierdo-García J, Villa P, Kyriazis A, Del Puerto-Nevado L, Pérez-Rial S, Rodriguez I, Hernandez E. Descriptive review of current NMR-based metabolomic data analysis packages. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2011;59:263–70
86. Ruxton G. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's *t*-test and the Mann-Whitney *U* test. *Behavioral Ecology*. 2006;17:688–90

87. Sullivan G, Feinn R. Using Effect Size - or Why the P Value Is Not Enough. *Journal of Graduate Medical Education*. 2012;4:279–82
88. Berben L, Sereika S, Engberg S. Effect size estimation: Methods and examples. *International Journal of Nursing Studies*. 2012;49:1039–47
89. Nishiumi S, Shinohara M, Ikeda A, Yoshie T, Hatano N, Kakuyama S, Mizuno S, Sanuki T, Kutsumi H, Fukusaki E, Azuma T, Takenawa T, Yoshida M. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics*. 2010;6:518–28
90. Jackson P, Attalla MI. N-Nitrosopiperazines form at high pH in post-combustion capture solutions containing piperazine: a low-energy collisional behaviour study. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010;24:3567–77.
91. Bathe O, Shaykhutdinov R, Kopciuk K, Weljie A, McKay A, Sutherland F, Dixon E, Dunse N, Sotiropoulos D, Vogel H. Feasibility of Identifying Pancreatic Cancer Based on Serum Metabolomics. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2011;20:140–8
92. Ouyang D, Xu J, Huang H, Chen Z. Metabolomic Profiling of Serum from Human Pancreatic Cancer Patients Using ¹H-NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011;165:148–54
93. Zhang L, Jin H, Guo X, Yang Z, Zhao L, Tang S, Mo P, Wu K, Nie Y, Pan Y, Fan D. Distinguishing pancreatic cancer from chronic pancreatitis and healthy individuals by ¹H-nuclear magnetic resonance-based metabonomic profiles. *Clinical Biochemistry*. 2012;45:1064–9
94. Xie G, Lu L, Qiu Y, Ni Q, Zhang W, Gao Y-T, Risch H, Yu H, Jia W. Plasma metabolite biomarkers for the detection of pancreatic cancer. *Journal of Proteome Research*. 2015;14:1195–202
95. Napoli C, Sperandio N, Lawlor R, Scarpa A, Molinari H, Assfalg M. Urine Metabolic Signature of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by ¹H-Nuclear Magnetic Resonance: Identification, Mapping, and Evolution. *Journal of Proteome Research*. 2012;11:1274–83
96. Davis V, Schiller D, Eurich D, Bathe O, Sawyer M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma is Associated with a Distinct Urinary Metabolomic Signature. *Annals of Surgical Oncology*. 2013;20:415–23
97. Bezabeh T, Ijare O, Albiin N, Arnelo U, Lindberg B, Smith I. Detection and quantification of D-glucuronic acid in human bile using ¹H-NMR spectroscopy: Relevance to the diagnosis of pancreatic cancer. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*. 2009;22:267–75

98. Beger R, Schnackenberg L, Holland R, Li D, Dragan Y. Metabonomic models of human pancreatic cancer using 1D proton NMR spectra of lipids in plasma. *Metabolomics*. 2006;2:125–34
99. Mayers J, Wu C, Clish C, Kraft P, Torrence M, Fiske B, Yuan C, Bao Y, Townsend M, Tworoger S, Davidson S, Papagiannakopoulos T, Yang A, Dayton T, Ogino S, Stampfer M, Giovannucci E, Qian Z, Robinson D, Ma J, Sesso H, Gaziano J, Cochrane B, Liu S, Wactawski-Wende J, Manson J, Pollak M, Kimmelman A, Souza A, Pierce K, Wang T, Gerszten R, Fuchs C, Heiden M, Wolpin B. Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development. *Nature Medicine*. 2014;20:1193–8
100. Hingorani S, Petricoin E, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz M, Ross S, Conrads T, Veenstra T, Hitt B, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta L, Crawford H, Putt M, Jacks T, Wright C, Hruban R, Lowry A, Tuveson D. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*. 2003;4:437–50
101. Patra K, Wang Q, Bhaskar P, Miller L, Wang Z, Wheaton W, Chandel N, Laaksi M, Muller W, Allen E, Jha A, Smolen G, Clasquin M, Robey R, Hay N. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell*. 2013;24:213–28
102. Xie H, Hanai J, Ren J, Kats L, Burgess K, Bhargava P, Signoretti S, Billiard J, Duffy K, Grant A, Wang X, Lorkiewicz P, Schatzman S, Bousamra II M, Lane A, Higashi R, Fan T, Pandolfi P, Sukhatme V, Seth P. Targeting lactate dehydrogenase-A inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell Metabolism*. 2014;19:795–809
103. Li F, Han X, Li F, Wang R, Wang H, Gao Y, Wang H, Gao Y, Wan X, Fang Z, Zhang W, Yao S, Tong X, Wan Y, Feng Y, Sun Y, Li Y, Wong K-K, Zhai Q, Chen H, Ji H. LKB1 Inactivation Elicits a Redox Imbalance to Modulate Non-small Cell Lung Cancer Plasticity and Therapeutic Response. *Cancer Cell*. 2015;27:698–711
104. Padanad M, Konstantinidou G, Venkateswaran N, Melegari M, Rindhe S, Mitsche M, Yang C, Batten K, Huffman K, Liu J, Tang X, Rodriguez-Canales J, Kalhor N, Shay J, Minna J, McDonald J, Wistuba I, DeBerardinis R, Scaglioni P. Fatty Acid Oxidation Mediated by Acyl-CoA Synthetase Long Chain 3 Is Required for Mutant KRAS Lung Tumorigenesis. *Cell Reports*. 2016;16:1614–28
105. Davidson S, Papagiannakopoulos T, Olenchok B, Heyman J, Keibler M, Luengo A, Bauer M, Jha A, O'Brien J, Pierce K, Gui D, Sullivan L, Wasylenko T, Subbaraj L, Chin C, Stephanopoulos G, Mott B, Jacks T, Clish C, Van Der Heiden M. Environment impacts the

- metabolic dependencies of ras-driven non-small cell lung cancer. *Cell Metabolism*. 2016;23:517–28
106. Fendrich V, Schneider R, Maitra A, Jacobsen I, Opfermann T, Bartsch D. Detection of precursor lesions of pancreatic adenocarcinoma in PET-CT in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Neoplasia*. 2011;13:180–6
 107. Ying H, Kimmelman A, Lyssiotis C, Hua S, Chu G, Fletcher-Sananikone E, Locasale J, Son J, Zhang H, Coloff J, Yan H, Wang W, Chen S, Viale A, Zheng H, Paik J, Lim C, Guimaraes A, Martin E, Chang J, Hezel A, Perry S, Hu J, Gan B, Xiao Y, Asara J, Weissleder R, Wang Y, Chin L, Cantley L, Depinho R. Oncogenic kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*. 2012;149:656–70
 108. Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Fukuda T, Sumida K, Deguchi Y, Mikata K, Nishioka K, Kawamura S, Uwagawa S, Suzui M, Alexander D, Tsuda H. Metabolomic and transcriptomic profiling of human K-ras oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*. 2013;34:1251–9
 109. LaConti J, Laiakis E, Mays A, Peran I, Kim S, Shay J, Riegel A, Fornace A, Wellstein A. Distinct serum metabolomics profiles associated with malignant progression in the KrasG12D mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Genomics*. 2015;16:1–10
 110. Yuneva MO, Fan TWM, Allen TD, Higashi R, Ferraris D, Tsukamoto T, Matés J, Alonso F, Wang C, Seo Y, Chen X, Bishop J. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metabolism*. 2012;15:157–70
 111. Qu A, Jiang C, Cai Y, Kim J, Tanaka N, Ward J, Ward J, Shah Y, Gonzalez F. Role of Myc in hepatocellular proliferation and hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology*. 2014;60:331–8
 112. Carter D, Sutton S, Pajic M, Murray J, Sekyere E, Fletcher J, Beckers A, De Preter K, Speleman F, George R, Haber M, Norris M, Cheung B, Marshall G. Glutathione biosynthesis is upregulated at the initiation of MYCN-driven neuroblastoma tumorigenesis. *Molecular Oncology*. 2016;10:866–78
 113. Kortlever R, Sodir N, Wilson C, Burkhart D, Pellegrinet L, Swigart L, Littlewood T, Evan G. Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell*. 2017;171:1301–15
 114. Wu H, Southam A, Hines A, Viant M. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Analytical Biochemistry*. 2008;372:204–12

115. Cui M-H, Branch C a, Cahill SM, Quinn TJ, Adem A, Libutti S, Yuan Z. In vivo proton MR spectroscopy of pancreatic neuroendocrine tumors in a multiple endocrine neoplasia type 1 conditional knockout mouse model. *Magnetic Resonance in Medicine*.2014;74:1221–26
116. Ling-hu T, Shen X, Tian J, Qin X. Investigation on Endogenous Metabolites in Pancreas of Diabetic Rats after Treatment by Genipin through ¹H-NMR-based Metabolomic Profiles. *Chinese Herbal Medicines*. 2016;8:133–8
117. Griffin J, Lehtimäki K, Valoneu P, Gröhn O, Kettunen M, Ylä-Herttuala S, Pitkänen A, Nicholson J, Kauppinen R. Assignment of ¹H-Nuclear Magnetic Resonance Visible Polyunsaturated Fatty Acids in BT4C Gliomas Undergoing Ganciclovir-Thymidine. 2003;63:3195–201
118. Woolson R. Wilcoxon Signed-Rank Test. *Wiley Encyclopedia of Clinical Trials*. 2008;(7):7–9
119. Klöppel G, Solcia E, Longnecker D, Capella C, Sobin L. Histological Typing of Tumours of the Exocrine Pancreas. 2^a edição. Springer Berlin Heidelberg. 1996
120. Maher A, Lindon J, Nicholson J. ¹H NMR-based metabonomics for investigating diabetes. *Future Medicinal Chemistry*. 2009;1:737–47
121. Won E, Yoon M, Kim S, Jung Y, Bae H, Lee D, Park S, Lee C-H, Hwang G-S, Chi S-W. Gender-Specific Metabolomic Profiling of Obesity in Leptin-Deficient ob/ob Mice by ¹H NMR Spectroscopy. *PLOS One*. 2013;8:1-14
122. Tian N, Wang J, Wang P, Song X, Yang M, Kong L. NMR-based metabonomic study of Chinese medicine Gegen Qinlian Decoction as an effective treatment for type 2 diabetes in rats. *Metabolomics*. 2013;9:1228–42
123. Arjmand M, Akbari Z, Taghizadeh N, Shahbazzadeh D, Zamani Z. NMR-based metabonomics survey in rats envenomed by *Hemiscorpius lepturus* venom. *Toxicon*. 2015;94:16–22
124. Montoliu I, Martin J, Collino S, Rezzi S, Kochhar S. Multivariate Modeling Strategy for Intercompartmental Analysis of Tissue and Plasma ¹H NMR Spectrotypes. *Journal of Proteome Research*. 2009;8:2397–406
125. Zyromski N, Mathur A, Gowda G, Murphy C, Swartz-Basile D, Wade T, Pitt H, Raftery D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolomics of the fatty pancreas: Implicating fat in pancreatic pathology. *Pancreatology*. 2009;9:410–9
126. He X-H. Metabonomic studies of pancreatic cancer response to radiotherapy in a mouse xenograft model using magnetic resonance spectroscopy and principal components analysis. *World Journal of Gastroenterology*.2013;19:4200-8

127. Weljie A, Newton J, Mercier P, Carlson E, Slupsky C. Targeted profiling: quantitative analysis of ¹H NMR metabolomics data. *Analytical Chemistry*. 2006;78:4430–42
128. Bharti S, Roy R. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2012;35:5–26
129. Makohon-Moore A, Iacobuzio-Donahue C. Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nature Reviews Cancer*. 2016;16:553–65
130. Muddana V, Whitcomb D, Khalid A, Slivka A, Papachristou G. Elevated serum creatinine as a marker of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(August 2008):164–70
131. Lankisch P, Weber-Dany B, Maisonneuve P, Lowenfels AB. High serum creatinine in acute pancreatitis: a marker for pancreatic necrosis? *American Journal of Gastroenterology*. 2010;105:1196–200
132. Jeon S-M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Experimental & Molecular Medicine*. 2016;89:1-13
133. Salminen A, Hyttinen J, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF-κB signaling and inflammation: Impact on healthspan and lifespan. *Journal of Molecular Medicine*. 2011;89:667–76
134. Du J, Martin S, Levine M, Wagner B, Buettner G, Wang S, Taghiyev A, Du C, Knudson C, Cullen J. Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*. 2010;16:509–20
135. Surjana D, Halliday G, Damian D. Role of Nicotinamide in DNA Damage, Mutagenesis, and DNA Repair. *Journal of Nucleic Acids*. 2010;2010:1–13
136. Andrabi S, Umanah G, Chang C, Stevens D, Karuppagounder S, Gagne J-P, Poirier G, Dawson V. Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proceedings of National Academy of Sciences* 2014;111:10209–14
137. Andrabi S, Umanah G, Chang C, Stevens D, Karuppagounder S, Gagne J-P, Poirier G, Dawson V, Dawson T. Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111:10209–14
138. Ferrer C, Sodi V, Reginato M. O-GlcNAcylation in Cancer Biology: Linking Metabolism and Signaling. *Journal of Molecular Biology*. 2016;428:3282–94
139. Barison A, Pereira da Silva C, Campos F, Simonelli F, Lenz C, Ferreira A. A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H-NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* . 2010;48:642-50

140. Guillén MD, Ruiz A. Edible oils: Discrimination by ¹H nuclear magnetic resonance. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 2003;83:338–46
141. Herner A, Sauliunaite D, Michalski C, Erkan M, Oliveira T, Abiatari I, Kong B, Esposito I, Friess H, Kleeff J. Glutamate increases pancreatic cancer cell invasion and migration via AMPA receptor activation and Kras-MAPK signaling. *International Journal of Cancer*. 2011;129:2349–59
142. Zhou W, Capello M, Fredolini C, Racanicchi L, Piemonti L, Liotta L, Novelli F, Petricoin E. Proteomic analysis reveals warburg effect and anomalous metabolism of glutamine in pancreatic cancer cells. *Journal of Proteome Research*. 2012;11:554–63
143. Son J, Lyssiotis C, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, Perera R, Ferrone c, Mullarky e, Chang-Shyh Ng, Kang Y, Fleming J, Bardeesy N, Asara J, Haigis M, DePinho R, Cantley L, Kimmelman A. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*. 2013;000:101–5
144. Csibi A, Lee G, Yoon SO, Tong H, Ilter D, Elia I, Fendt S-M, Roberts T, Blenis J. The mTORC1/S6K1 pathway regulates glutamine metabolism through the eif4b-dependent control of c-Myc translation. *Current Biology*. 2014;24:2274–80
145. Moses M, Neckers L. The GLU that Holds Cancer Together: Targeting GLUamine Transporters in Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2015;27:317–9
146. Raimundo N, Baysal B, Shadel G. Revisiting the TCA cycle: Signaling to tumor formation. *Trends in Molecular Medicine*. 2011;17:641–9
147. Eales K, Hollinshead K, Tennant D. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*. 2016;5:1-8
148. Parks S, Cormerais Y, Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia optimises tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export. *Molecular Aspects of Medicine*. 2016;47-48:3–14
149. Phang J, Liu W, Hancock C, Fischer J. Proline metabolism and cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care Journal*. 2015;18:71-7
150. Liu W, Hancock C, Fischer J, Harman M, Phang J. Proline biosynthesis augments tumor cell growth and aerobic glycolysis: Involvement of pyridine nucleotides. *Scientific Reports*. 2015;5:1–13
151. Baracos V, Mackenzie M. Investigations of Branched-Chain Amino Acids and Their Metabolites in Animal Models of Cancer. *The Journal of Nutrition*. 2006;237–42
152. Ma Z, Vocadlo D, Vosseller K. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-κB activity in pancreatic cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288:15121–30

153. Banerjee P, Lagerlöf O, Hart G. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Molecular Aspects of Medicine*. 2016;51:1–15
154. Brandi J, Dando I, Pozza E, Biondani G, Jenkins R, Elliott V, Park K, Fanelli G, Zolla L, Costello E, Scarpa A, Cecconi D, Palmieri M. Proteomic analysis of pancreatic cancer stem cells: Functional role of fatty acid synthesis and mevalonate pathways. *Journal of Proteomics*. 2017;150:310–22
155. Dang C. MYC, microRNAs and glutamine addiction in cancers. *Cell Cycle*. 2009;8:3243–5
156. Schnelldorfer T, Gansauge S, Gansauge F, Schlosser S, Beger H, Nussler A. Glutathione Depletion Causes Cell Growth Inhibition and Enhanced Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer*. 2000;89:1440–7